

Untersuchungen zur Rolle des onkogenen Transkriptionsfaktors STAT3 im kolorektalen Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Florian Matthias Corvinus

geboren am 17. Januar 1977 in Frankfurt am Main

Angefertigt am Institut für Biochemie I der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Betreuer: PD Dr. Karlheinz Friedrich

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der Abgabe:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| AA | Acrylamid |
| Abl | intrazelluläre Tyrosinkinase |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| APC | <i>Adenomatous Polyposis Coli</i> |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> , Datenbank |
| Bis | Bisacrylamid |
| bFGF | <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CEA | Carcinogenes Embryonale Antigen (Tumormarker) |
| CIN | Chromosomale Instabilität |
| CIS | <i>Cytokine Inducible SH-2-domain Containing Protein</i> |
| CML | Chronisch Myeloische Leukämie |
| CRC | kolorektales Karzinom (<i>colorectal cancer</i>) |
| DCC | <i>Deleted in Colorectal Cancer</i> , Gen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Entzündungsgrad |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EMSA | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> |
| FAP | Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| gp | Glykoprotein |
| G | Differenzierungsgrad/ Malignitätsgrad |
| HE | Hämatoxylin/ Eosin |
| HGF | <i>Hepatocyte Growth Factor</i> |
| HNPCC | <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| JAB | <i>Jak Binding Protein</i> |

| | |
|----------|---|
| JAK | Januskinase |
| K | Kontrolle |
| k.A. | keine Angabe |
| k-ras | GTP-ase |
| Lef | <i>late Expression Factor</i> |
| LIF | <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> |
| MCC | <i>Mutated in Colorectal Cancer, Gen</i> |
| MSI | Mikrosatelliten Instabilität |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| nm23 | <i>no metastasis gen</i> |
| m67 | Mutante von SIE |
| n.u. | nicht untersucht |
| OSM | Onkostatin M |
| P | phosphoryliert |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PIAS | <i>Protein Inhibitors of Activated STAT</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| Pod | Peroxidase |
| PRL | Prolaktin |
| RG | Randgewebe |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SMAD | Transkriptionsfaktor |
| SH | <i>Src-Homology</i> (Domäne) |
| SHP | <i>SH-2 Domain Containing Phosphatase</i> |
| SIE | <i>Sis-Inducible Element</i> |
| SMAD | Transkriptionsfaktor |
| SOCS | <i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i> |
| Src | Intrazelluläre Tyrosinkinase |
| SOCS | <i>Suppressors of Cytokine Signalling</i> |
| SSI-1 | <i>STAT-Induced STAT-Inhibitor-1</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| StemSpan | Eigenname; serumfreies Medium |

| | |
|-------|--|
| T | Tween20 |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> |
| Tcf | <i>Transcription Factor 1</i> |
| TK | Tyrosinkinase |
| TEMED | N`N`N`N-Tetramethyl-ethylendiamin |
| TGF | <i>Tumor Growth Factor</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| TNM | T- Primärtumor N- regionale Metastasen der Noduli lymphatici M- Fernmetastasen |
| TU | Tumorgewebe |
| Tyk | Tyrosinkinase |
| tyr | Tyrosin |
| UICC | <i>Union International Contre le Cancer</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| Wnt | <i>Wingless-Type MMTV Integation Site Family Member 1</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Das kolorektale Karzinom – eine Krebserkrankung mit hoher Relevanz | 3 |
| 2.1.1 | Epidemiologie und Demographie | 3 |
| 2.1.2 | Ätiologie | 4 |
| 2.1.3 | Die Adenom-Karzinom-Sequenz – Schrittweise Tumorentstehung auf..... molekular-pathologischer Ebene | 4 |
| 2.1.4 | Pathologische Einteilung und Klassifikationen | 7 |
| 2.1.4.1 | Die verschiedenen Wachstumsformen | 7 |
| 2.1.4.2 | Einteilung nach histologischen Typen | 7 |
| 2.1.4.3 | Malignitätsgrad (Grading) | 7 |
| 2.1.4.4 | TNM-Klassifikation | 7 |
| 2.1.5 | Metastasierung | 8 |
| 2.1.6 | Prognose | 8 |
| 2.1.7 | Therapie | 8 |
| 2.1.7.1 | Die konventionelle Chemotherapie | 8 |
| 2.1.7.2 | Neue Substanzen in der Therapie des metastasierten Stadiums | 9 |
| 2.2 | Signaltransduktion durch den JAK/STAT-Weg | 10 |
| 2.2.1 | Zelluläre Kommunikation durch Signaltransduktion | 10 |
| 2.2.2 | Aktivierung des JAK/STAT-Weges | 11 |
| 2.2.3 | Kinetik und Regulation | 12 |
| 2.2.4 | Struktur der STAT-Proteine | 13 |
| 2.2.5 | STAT-Funktionen | 14 |
| 2.2.5.1 | STAT5 | 14 |
| 2.2.5.2 | STAT1 | 14 |
| 2.3 | STAT3 - ein Transkriptionsfaktor mit vielen Gesichtern | 16 |
| 2.3.1 | Die Splicevarianten | 17 |
| 2.3.2 | STAT3 und Onkogenese | 18 |
| 3 | Ziele der Arbeit | 22 |
| 4 | Material und Methoden | 23 |
| 4.1 | Herstellernachweis | 23 |
| 4.2 | Antikörper | 24 |
| 4.3 | Gewebeproben | 24 |
| 4.4 | Zelllinien und Zellkultur | 25 |
| 4.4.1 | Kultivationsbedingungen | 26 |
| 4.4.2 | Zytokinstimulationen | 26 |
| 4.4.3 | Virale Transduktion der Zelllinien | 27 |
| 4.4.4 | Zytometrische Expressionsanalysen | 29 |
| 4.4.5 | MTS-Proliferationstest | 29 |
| 4.4.6 | Transplantation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 in Nacktmäuse.... | 30 |
| 4.5 | Zellyse und Gewebeaufschluß | 30 |
| 4.5.1 | Zell und Gewebelysate für EMSA | 30 |
| 4.5.2 | Zell und Gewebelysate für Western Blots | 31 |
| 4.6 | Induktion des doxyzyklin-regulierbaren Promotors | 31 |
| 4.6.1 | Proteinbestimmung nach Bradford | 31 |
| 4.6.2 | SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese | 31 |
| 4.6.3 | Western Blot | 32 |
| 4.6.4 | Electrophoretic Mobility Shif Assay (EMSA) | 33 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.7 | Histologische und immunhistochemisch Untersuchungen | 35 |
| 5 | Ergebnisse | 37 |
| 5.1 | Untersuchung der STAT-Aktivität in Tumorbiopsien kolorektaler Karzinompatienten | 37 |
| 5.1.1 | STAT3- und STAT1-Aktivität im entarteten Gewebe | 37 |
| 5.1.2 | STAT-Aktivität im angrenzenden Gewebe kolorektaler Tumoren | 42 |
| 5.1.3 | Immunhistologische Lokalisation der STAT3-Aktivität in Tumorproben | 46 |
| 5.1.4 | Analyse der STAT1- und STAT3-Aktivität in Primärtumoren kolorektaler Karzinomzelllinien | 51 |
| 5.2 | Expression und Aktivierung heterologer STAT3-Konstrukte in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms | 54 |
| 5.2.1 | Zytometrische Analyse verschiedener kolorektaler Tumorzelllinien nach Transduktion mit Expressionskonstrukten für STAT3 | 55 |
| 5.2.2 | Funktionelle Analyse heterologer STAT3-Konstrukte in kolorektalen Karzinomzelllinien | 58 |
| 5.3 | Untersuchungen zur STAT3-Funktion in kolorektalen Karzinomzelllinien | 64 |
| 5.3.1 | Einfluß von STAT3 auf die Proliferation kolorektaler Karzinomzelllinien | 64 |
| 5.3.2 | Tumorstadium nach xenogener Transplantation der Zelllinie | 68 |
| 5.3.3 | DNA-Bindung, Phosphorylierung und Expression von STAT3 in xenogenen Tumoren von HT-29-Zellen | 69 |
| 5.4 | Mögliche Wege zu einer konstitutiven STAT3-Aktivierung in kolorektalen Karzinomen | 75 |
| 5.4.1 | Untersuchungen zur zytokinabhängigen STAT3-Aktivierung in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms | 75 |
| 5.4.2 | Modifizierung der STAT3-Aktivität in HT-29 durch forcierte Zell-Zell- Kontakte | 77 |
| 6 | Diskussion | 80 |
| 6.1 | Die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 sind in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms aktiviert | 80 |
| 6.2 | Aktiviertes STAT3 führt zu einer Zunahme der Malignität kolorektaler Tumorzelllinien | 85 |
| 6.3 | Mögliche Mechanismen der konstitutiven STAT3-Aktivität in kolorektalen Tumoren | 90 |
| 6.4 | Die klinische Bedeutung konstitutiver STAT3-Aktivität für das kolorektale Karzinom | 94 |
| 7 | Schlußfolgerungen | 97 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 99 |
| 9 | Anhang | 110 |

1. Zusammenfassung

Die koordinierte Funktion vieler signalvermittelnder Proteine ist entscheidend für die Angemessenheit des Verhaltens von Zellen in Gewebe und Organismus. Fehlerhaft regulierte Aktivität vieler Signalmediatoren wurde mit der onkogenen Transformation von Zellen korreliert. Ein wichtiger Regulator malignitätsrelevanten Zellverhaltens ist der „*Signal Transducer and Activator of Transcription*“ STAT3. STAT3 steuert fundamentale zellphysiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch Zytokin- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren meist unter Vermittlung von Tyrosin-Kinasen der Janus Kinase (JAK)-Familie aktiviert und reguliert nach Phosphorylierung, Dimerisierung und Kerntranslokation die Transkription spezifischer Zielgene.

Obwohl der JAK/STAT-Signalweg an krebsrelevanten Prozessen vieler Tumorerkrankungen (z.B. dem Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom und Nierenzellkarzinom) beteiligt ist, existieren kaum grundlegende Untersuchungen zur STAT-Funktion im ansonsten molekular gut studierten kolorektalen Karzinom (CRC). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Aktivität von STAT3 in diesem besonders häufigen Karzinom untersucht. Hierzu wurden die Tumorproben von 17 unterschiedlichen Patienten bezüglich ihrer STAT3-Aktivität im Vergleich zum jeweils zugehörigen Randgewebe analysiert. In der Mehrzahl der Fälle konnte eine STAT3-Aktivierung in Zellen des Tumorgewebes nachgewiesen werden. Ein Vergleich der STAT3-Aktivität zwischen Tumorzellen und den nicht-transformierten Zellen der angrenzenden Darmschleimhaut zeichnete ein unscharfes Bild. So konnte im Randgewebe einerseits in mehreren untersuchten Proben eine geringere Intensität der STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden. Andererseits fanden sich zwischen Tumor und Randgewebe ebenso umgekehrte Verhältnisse in bezug auf die STAT3-Aktivität.

Die Auswirkungen dieser nachgewiesenen STAT3-Aktivierung auf das kolorektale Karzinom wurden anhand von fünf Kolonkarzinomzelllinien näher untersucht. Erstaunlicherweise konnte in keiner dieser Zelllinien eine STAT3-Aktivität nachgewiesen werden. Analysen zur STAT3-DNA-Bindungsaktivität in den primären Tumoren, aus denen drei der untersuchten Zelllinien entwickelt worden waren, bestätigten jedoch, daß kolorektale Tumorzellen während ihrer Kultivierung ihre STAT3-Aktivität verlieren. Um dennoch Aussagen über die STAT3-Funktionen im CRC treffen zu können, wurden in vier kolorektalen Karzinomzelllinien durch retrovirale Transduktion drei funktionell unterschiedliche STAT3-Varianten stabil (über-) exprimiert. (1) Die wildtypische Form von STAT3 („w.t. STAT3“). (2) Ein durch den

Austausch zweier Aminosäuren zu Cystein verändertes STAT3, das durch die Bildung von Disulfidbrücken spontan dimerisiert und daher konstitutiv aktiviert ist („c.a. STAT3“). (3) Eine dominant negative STAT3-Mutante („d.n. STAT3“), die durch den Austausch eines Tyrosinrestes zu Phenylalanin nicht durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. Mit Hilfe dieser transduzierten Zellerivate konnte in Analysen zum Proliferationsverhalten ein wachstumsfördernder Einfluß von STAT3 nachgewiesen werden. Des weiteren zeigte sich, daß in allen untersuchten Zelllinien durch IL-6-Stimulation STAT3-Aktivierung induziert wird. Auch diese wirkt sich fördernd auf das Wachstumsverhalten aller Zelllinien aus.

Es wurden auch Untersuchungen zur Wirkung von STAT3 auf die Tumorgenität im Mausmodell durchgeführt. Hierbei wurden die Zelllinie HT-29 und ihre Derivate HT-29 w.t. STAT3 und HT-29 c.a. STAT3 subkutan in Nacktmäuse transplantiert. Die entstandenen xenogenen Tumoren ließen hinsichtlich ihrer Größe keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Die Untersuchungen zur STAT3-DNA-Bindung in den entstandenen Tumoren zeigten eine STAT3-Aktivität auf äquivalentem Niveau in allen HT-29-Derivaten, obwohl ein Verlust der STAT3-Expression ausgeschlossen werden konnte. Dies zeigt, daß Kolonkarzinomzellen während der Tumorbildung im murinen Organismus STAT3 aktivieren und läßt vermuten, daß HT-29-Zellen trotz Überexpression unterschiedlicher STAT3-Varianten die STAT3-Aktivität durch Regulationsmechanismen auf ein bestimmtes Niveau begrenzen. Hieraus könnten sich auch die geringen Unterschiede der Tumorgroße zwischen den einzelnen Gruppen erklären.

Weiterführende Untersuchungen widmeten sich der Frage nach den Entstehungsmechanismen der STAT3-Aktivität in kolorektalen Karzinomzellen. Dabei konnte anhand von Zytokinstimulationen gezeigt werden, daß IL-6, im Gegensatz zu Zytokinen wie OSM, LIF oder IL-11, in Zelllinien des Kolonkarzinoms zu STAT3-Aktivierung führt. Des weiteren zeigte sich, daß in Zellen der Zelllinie HT-29 durch eine experimentelle Verstärkung von Zell-Zell-Kontakten eine autokrine STAT3-Aktivierung induziert wird.

Diese Ergebnisse liefern ermutigende Hinweise für die Eignung von STAT3 als Zielmolekül in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Therapie des kolorektalen Karzinoms.

2. Einleitung

2.1 *Das kolorektale Karzinom – eine Krebserkrankung von hoher Relevanz*

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (CRC) faßt man die bösartigen Erkrankungen des Dickdarms und des Mastdarms zusammen. Aufgrund seiner Häufigkeit in den Industrienationen und der erheblichen Konsequenzen seiner Diagnose für den einzelnen Patienten ist es eine Erkrankung von hoher medizinischer und gesellschaftlicher Relevanz. Im Wandel der Zeit haben eine Vielzahl bemerkenswerter Forschungsergebnisse das Verständnis der Entstehung und Wirkungsweise dieser Erkrankung wesentlich geprägt. Diese Erkenntnisse haben die Möglichkeiten der modernen Tumorthherapie entscheidend beeinflusst und spiegeln sich in einem Rückgang der Sterberaten und verlängerten 5-Jahres-Überlebensraten wieder.

2.1.1 Epidemiologie und Demographie

Nach Angaben des Robert Koch-Instituts liegt die Erkrankungsrate (Inzidenz) für das kolorektale Karzinom in Deutschland im Vergleich mit anderen europäischen Ländern sowohl bei Männern als auch bei Frauen an erster Stelle, gefolgt von den Niederlanden und Luxemburg. Die niedrigsten Erkrankungsraten innerhalb der EU findet man in Griechenland, Finnland und Italien (Robert Koch-Institut 2004).

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken nach Schätzungen der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister jährlich über 32.000 Männer und 34.000 Frauen an bösartigen Erkrankungen des Kolorektums. Es ist daher mittlerweile die zweithäufigste Krebserkrankung beider Geschlechter, nach dem Prostatakarzinom bei Männern und Brustkrebs bei Frauen. Die dritthäufigste Krebserkrankung beider Geschlechter ist das Bronchialkarzinom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister 2004).

Das mittlere Manifestationsalter liegt für Männer mit 68 und Frauen mit 73 Jahren vergleichsweise hoch, nur 5% aller Patienten sind jünger als 43 Jahre. Bei einer Manifestation der Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr handelt es sich zumeist um eine erbliche Form des kolorektalen Karzinoms (Köhne und Harstrick 2001).

Darmkrebs ist für Frauen mit 16,3% und für Männer mit 12,4% die zweithäufigste Krebstodesursache. Unter Berücksichtigung der normalen Lebenserwartung verliert die Gesellschaft durch das CRC jährlich schätzungsweise 160.000 Lebensjahre bei Männern und

200.000 Lebensjahre bei Frauen. Es ist damit zu rechnen, daß etwa 6% der Bevölkerung, in der Bundesrepublik sind dies fast 5 Millionen Menschen, im Laufe ihres Lebens ein kolorektales Tumorleiden entwickeln (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2001). Die Sterberaten beider Geschlechter nehmen seit Mitte der 70er Jahre stetig ab (Robert Koch-Institut 2004).

Im internationalen Vergleich gelten besonders die Industrienationen Nordamerikas, Europas sowie Australien als Regionen mit hoher Inzidenz. Allein in den USA werden jährlich 130.000 Neuerkrankungen und 55.000 Todesfälle registriert (American Cancer Society 1997).

2.1.2 Ätiologie

Die internationalen Unterschiede der Neuerkrankungsrate spiegeln im Wesentlichen diätetische und umweltabhängige Einflüsse bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms wider (World Cancer Research Fund 1997).

Auch eine Reihe endogener Risikofaktoren begünstigen das CRC. So haben Patienten mit positiver Familienanamnese in der Verwandtschaft ersten Grades eine höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit. Ein erhöhtes Risiko besteht auch bei Dysplasien des Kolorektrums, Colitis ulcerosa und malignen Vorerkrankungen wie z.B. Mamma-, Ovarial-, oder Endometriumkarzinom.

Obwohl die erblichen Syndrome wie die FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) und das HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) nur etwa 5% aller Dickdarmtumoren verursachen, haben sie zu wesentlichen Erkenntnissen über die Tumorentstehung geführt (Schmieglar 1999, Sachar 1994).

2.1.3 Die Adenom-Karzinom-Sequenz – Schrittweise Tumorentstehung auf molekularpathologischer Ebene

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist die Erkenntnis seiner schrittweisen Entwicklung aus Tumorstufen, den Adenomen, von fundamentaler Bedeutung. Der histologische Übergang des Adenoms in ein Karzinom konnte molekularpathologisch untermauert werden. Man beobachtet genetische Veränderungen in einer regelhaften Abfolge, die sich direkt mit histologisch morphologischen Korrelaten des Kolorektrums verknüpfen lassen. Die Dysplasie nimmt innerhalb dieses Modells eine Mittelstellung zwischen normaler Schleimhaut und invasivem Karzinom ein, wobei ein stufenweiser Übergang von gesunder Schleimhaut über eine geringgradige (low grade) zu einer hochgradigen (high grade) Dysplasie beobachtet wird (Köhne 2001) (Narayan und Roy 2003).

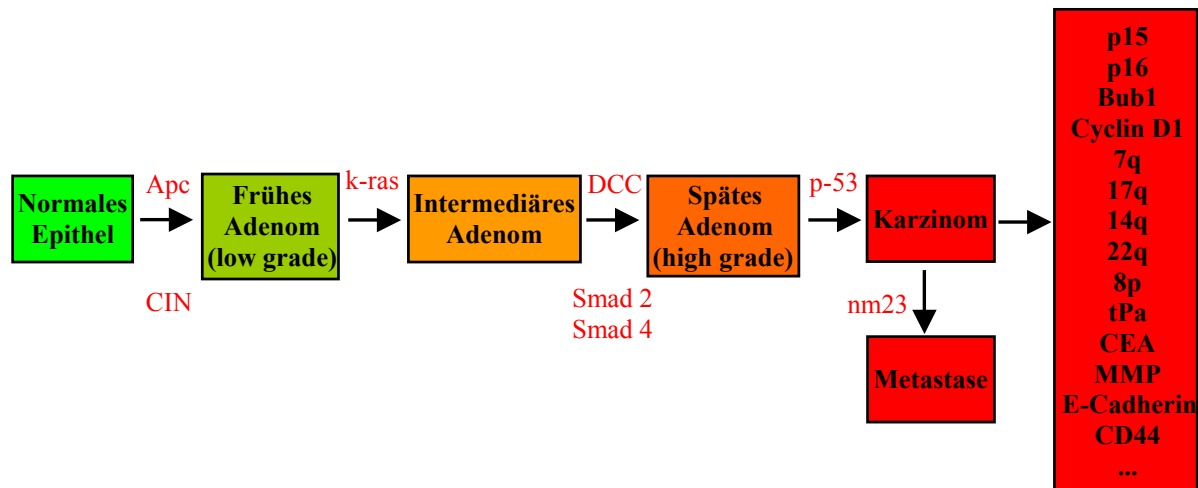


Abb.1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Ein Modell der genetischen Veränderungen kolorektaler Neoplasien (modifizierte Abbildung nach Fernhead et al. 2001) Details siehe Text.

Die molekularen Mechanismen der Karzinogenese sind seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung (Narayan und Roy 2003). Die Ergebnisse weltweiter Arbeitsgruppen wurden hierbei in dem von Bernd Vogelstein geprägten Begriff der Adenom-Karzinom-Sequenz zusammengeführt (Vogelstein et al. 1988). Im Verlauf dieses mehrstufigen Prozesses kommt es zur Akkumulation genetischer Veränderungen (Abb. 1).

Die in der Literatur als „first hit“ beschriebene Mutation des Tumorsuppressorgens *apc* (Adenomatous polyposis coli) wird in 60-80% der Tumorpatienten gefunden. Für das *apc*-Gen namensgebend wurde die Familiäre Adenopolyposis Coli (FAP), eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, in deren Verlauf sich hunderte bis tausende Kolonadenome entwickeln. Das Entartungsrisiko liegt bei 100 % (Becker et al. 2002).

Apc ist Teil des Wnt-Signalweges, der nach Bindung eines Liganden (z.B. Wnt) an den Rezeptor (z.B. Frizzled) zu einer erhöhten intrazellulären β -Cateninkonzentration führt. Dies aktiviert den Transkriptionsfaktorkomplex Tcf/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor), zu dessen Zielgenen z.B. das Protoonkogen *c-myc*, sowie cyclin D1, mehrere Matrix Metalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie gehören. *Apc* reguliert den Abbau des β -Catenins, so daß es durch die Mutation zur erhöhten Transkription der Tcf/Lef-Zielgene kommt (Bienz 1999).

Die Aufgaben des *Apc* sind vielseitig. Neben der Zellzykluskontrolle (Narayan und Roy, 2003) steuert es auch die *Migration* der Epithelzellen während der Schleimhautregeneration. Die Mutation führt zur Akkumulation der Zellen an der Kryptenbasis und wird daher als ursächlich für die Entstehung von adenomatösen Wachstumsformen beschrieben (Moss et al. 1996). Da *Apc* über Bindung an Axin und β -Catenin das Zytoskelett und die interzelluläre Adhäsion stabilisiert, führt sein Defekt zum Polaritätsverlust transformierter Epithelzellen

(Bright-Thomas und Hargest 2003). Es konnte auch ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität (CIN) und der *apc*-Mutation (Adenomatous polyposis coli) hergestellt werden. Da das Apc während der Mitose die Bindung zwischen den Mikrotubuli des Spindelapparates und den Kinetochoren der Chromosomen vermittelt, kann seine Mutation zur chromosomalen Instabilität und der damit verbundenen Aneuploidie der Tumoren führen (Fodde et al. 2001 Kaplan et al. 2001). Ein anderer Weg zur erhöhten Mutationsrate kolorektaler Karzinome ist die Instabilität der Mikrosatelliten (MSI), bei der die Mechanismen des DNA-Repairment mutieren (Buermeyer et al. 1999). Die Vielzahl der Funktionen und Interaktionen einzelner Wnt-Signalproteine bindet den Wnt-Weg daher in ein sehr umfangreiches Netzwerk ein (Arias et al. 1999).

Eine weitere sehr häufige und frühe Mutation im Ablauf der Sequenz ist die *k-ras* Mutation (Kirsten-ras) (Vogelstein et al. 1988). Die Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Ras-GTPase, die eine Vielzahl intrazellulärer Signalproteine mit proliferativen, antiapoptotischen oder migrationsfördernden Effekten aktiviert (Ross et al. 2001). Im Rahmen der RASCAL Multicenterstudie konnte in einer großen Population sowohl eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit als auch ein erhöhtes Rezidivrisiko mit dieser Mutation korreliert werden (Andreyev et al. 1998 und 2001). Vogelstein wies die *k-ras*-Mutation in 40% der Dysplasien größer als 1 cm und bei über 60% der kolorektalen Tumoren nach (Vogelstein et al. 1988).

Wie in vielen anderen Neoplasien wurde auch im CRC die Mutation und die damit einhergehende Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 beobachtet. Dieses spielt eine Schlüsselrolle bei der antimitogenen Kontrolle des Zellzyklus. Die Mutation wird in über 70% der kolorektalen Karzinome gefunden und wird als ursächlich für den Übergang der hochgradigen Dysplasie zum Karzinom beschrieben. Die Mutation des *dcc*-Gens (deleted in colorectal carcinoma) führt durch den Defekt eines Adhäsionsmoleküls zur Metastasierung. Das Metastasensuppresorgen nm23 (non-metastasis 23) ist in metastasierten kolorektalen Karzinomen oft unterexprimiert oder mutiert (Köhne 2001).

Trotz der großen Fortschritte bei der Aufklärung molekularer Mechanismen während der Karzinogenese kolorektaler Tumoren bleiben viele Fragen offen. Eine von Smith 2002 angelegte Kohortenstudie konnte nur 6,6% der untersuchten Kolonkarzinompatienten mit dem oben genannten klassischen Weg in absolute Übereinstimmung bringen (Smith et al. 2002). Die Entstehungsmechanismen des kolorektalen Karzinoms sind demnach sehr heterogen. Neben dem gezeigten Modell existieren eine Vielzahl alternativer molekularer Wege, so daß

es sich hierbei weiterhin um ein interessantes und komplexes Forschungsfeld handelt (Narayan und Roy 2003).

2.1.4 Pathologische Einteilungen und Klassifikationen

2.1.4.1 Die verschiedenen Wachstumsformen

Das kolorektale Karzinom tritt makroskopisch entweder polypös (25%), plattenartig (15-20%), ulzerös (55-60%) oder szirrhös als diffuse Wandverdickung (etwa 1% der Fälle) in Erscheinung. Verschiedene Wachstumsarten begünstigen die unterschiedlichen Komplikationen wie Ileus, Blutungen oder Stenosen (Köhne 2001).

2.1.4.2 Einteilung nach histologischen Typen

Die WHO unterscheidet in der internationalen histologischen Klassifikation 7 verschiedene Karzinomtypen des Kolorektums: Adenokarzinome (85-90%), muzinöse Adenokarzinome (10%) und die eher seltenen Siegelringkarzinome, Plattenepithelkarzinome, adeno-squamöse Karzinome, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome (Köhne 2001). Adenokarzinome zeigen unterschiedlich ausgeprägte Drüsenbildung ohne stärkere Schleimbildung, muzinöse Karzinome hingegen zeichnen sich durch Verschleimung aus (Jass 1989).

2.1.4.3 Malignitätsgrad (Grading)

Adeno- und muzinöse Karzinome werden nach Ausprägung der Drüsenbildung, Kernpolymorphismen und Mitosen in unterschiedliche Differenzierungsgrade eingeteilt.

- **G1** gut
- **G2** mäßig
- **G3** schlecht
- **G4** undifferenziert

G1 und G2 werden als niedrig maligne, G3 und G4 als hochmaligne zusammengefaßt. Der Differenzierungsgrad liefert Hinweise über die wahrscheinliche Tumorausbreitung zum Diagnosezeitpunkt und bestimmt somit die Prognose (Köhne 2001).

2.1.4.4 TNM-Klassifikation (Staging)

Eine genaue Einteilung der Tumorausbreitung erfolgt durch das von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) etablierte TNM-System. Hierbei beschreibt **T** die Infiltrationstiefe, **N** das Ausmaß der lymphogener Metastasierung und **M** das Vorliegen von Fernmetastasen. Der R-Status liefert Hinweise über die Situation des Residualtumors nach chirurgischer Therapie und beruht sowohl auf Aussagen des Operators aus klinischer Sicht als auch auf

dem pathologischen Befund unter histologischem Aspekt. Der TNM-Status bestimmt das therapeutische Vorgehen (Köhne 2001).

2.1.5 Metastasierung

Etwa 15-20% aller kolorektalen Karzinome zeigen zum Zeitpunkt ihrer Diagnose bereits lymphogene oder hämatogene Metastasen. Kolon- und höher sitzende Rektumkarzinome führen in erster Linie über die Pfortader zu Lebermetastasen. Tiefere Rektumkarzinome können hingegen über die Vena mesenterica inferior pulmonal und in seltenen Fällen über das vertebrale Venengeflecht in die Wirbelsäule streuen. Nach Einbruch des Tumors in das Peritoneum erfolgt die Metastasierung abdominal per continuitatem (Wagner 1994).

2.1.6 Prognose

Eine definitive Heilung ist nur durch chirurgische Therapie in frühen Tumorstadien möglich. Bei bis zu 2/3 der Patienten werden nach einer R0 Resektion lokale, regionale oder Fernmetastasen auftreten (Seufferlein 2003). Für das kolorektale Karzinom liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Männer inzwischen bei 52% und für Frauen bei 55%. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Mastdarmkrebs hat sich aufgrund der Therapieerfolge verbessert und liegt für Männer bei 51% und Frauen bei 52% (Robert Koch-Institut Deutschland 2004).

2.1.7 Therapie

Das therapeutische Vorgehen richtet sich maßgeblich nach dem Tumorstadium. Eine kurative Zielsetzung erfordert immer die chirurgische Intervention. Hierbei wird je nach Lokalisation des Tumors der betreffende Darmabschnitt mit entsprechendem Abstand zum gesunden Gewebe reseziert. In fortgeschrittenem Stadium kann durch adjuvante Chemotherapie postoperativ die Aussicht auf Heilung erheblich verbessert werden. Das metastasierte Kolonkarzinom wird palliativ mit Chemotherapeutika behandelt und je nach Krankheitsverlauf werden stenosierende Darmabschnitte und solitäre Metastasen in Hinblick auf eine Verbesserung der Lebensqualität reseziert (Köhne 2001).

2.1.7.1 Die konventionelle Chemotherapie

Im Rahmen zahlreicher Studien wurden innerhalb der letzten 20 Jahre große Fortschritte in der chemotherapeutischen Behandlung des CRC erzielt. Die effektivste Substanz, der Thymidilatsynthetaseinhibitor 5-Fluoruracil (5-FU), steht hierbei im Mittelpunkt und wird in der Kombination mit Folinsäure in seiner Wirkung moduliert. Eine Kombination des 5-FU mit dem interkalierenden Platinderivat Oxaliplatin oder dem Topoisomeraseinhibitor

Irinotecan haben weiterhin zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebensraten geführt (Köhne 2001).

2.1.7.2 Neue Substanzgruppen in der Therapie des metastasierten Stadiums

Bei der Suche nach einer zielgerichteten Tumorthherapie wurden besonders in den letzten Jahren Durchbrüche erzielt. Diese beruhen auf molekularbiologischen Erkenntnissen über Regulationsmechanismen des tumorösen Wachstums.

So wurden spezifische Antikörper gegen proliferationsfördernde Cytokine wie EGF und VEGF entwickelt. Der EGF-Antikörper Cetuximab und der VEGF-Antikörper Bevacizumab wurden klinisch erprobt und erhielten im Jahr 2004 in Deutschland die Zulassung zur therapeutischen Anwendung bei Patienten im metastasierten Stadium. Des weiteren befinden sich spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren in Erprobung (Hartmann 2004).

2.2 *Signaltransduktion durch den JAK/STAT-Weg*

2.2.1 Zelluläre Kommunikation durch Signaltransduktion

Den typischen Eigenschaften, den Funktionen und der Morphologie eines Gewebes liegen bestimmte Kommunikationsprozesse zwischen Zellen untereinander, ihrer Umgebung und dem gesamten Organismus zu Grunde. Zellen verfügen hierfür über komplexe Kommunikationsmechanismen, zu denen neben den klassischen Hormonen, wie z.B. dem Östrogen, die Sekretion der Zytokine (Gewebehormone) gehören. Zytokine sind Polypeptide niedermolekularer Masse. Sie kontrollieren eine Vielzahl essentieller Prozesse eines Organismus wie z.B. Zellwachstum, Entwicklung, Überleben, Regeneration, Differenzierung oder den kontrollierten Zelltod (Apoptose). Außerdem koordinieren sie globale Reaktionen wie die Entzündungsreaktion oder die Immunantwort. Man bezeichnet ihre Wirkungsweise als autokrin (eine Zelle stimuliert sich selbst), als parakrin (eine Zelle stimuliert Zellen ihrer Umgebung) oder als endokrin (ein Zytokin wirkt auf den gesamten Organismus). Ein Zytokin kann auf viele verschiedene Zelltypen wirken (Pleiotropie) und zu additiven, synergistischen aber auch antagonistischen Reaktionen ihrer Zielzellen führen, (funktionelle Redundanz). Außerdem ist ihre Wirkung durch den Rezeptorstatus und das aktuelle genetische Programm der Zielzellen gewebespezifisch. Trotz der Pleiotropie, der Vielzahl überschneidender Effekte und der unterschiedlichen Wirkungsweisen in verschiedenen Geweben, handelt es sich um spezifische und streng kontrollierte Prozesse.

Auf eine Zelle einwirkende Signale werden durch kaskadenartige Aktivierung intrazellulärer Mediatoren umgesetzt, Signaltransduktion. Die koordinierte Funktion intrazellulärer signalvermittelnder Proteine ist Voraussetzung für ein physiologisches Verhalten der Zellen im Organismus. Fehlerhaft regulierte Aktivität vieler Signalproteine konnte mit der Entwicklung maligner Zelleigenschaften wie unkontrollierter Proliferation, infiltrierendem Wachstum, Hemmung des programmierten Zelltodes, Entdifferenzierung und Metastasierung korreliert werden (Heinrich et al. 1998, Nicola 1994, Arai et al. 1990).

2.2.2 Aktivierung des JAK/STAT-Weges

Der JAK/STAT-Weg beschreibt die rezeptorvermittelte Aktivierung verschiedener intrazellulärer Mediatoren und führt zur Transkriptionskontrolle bestimmter Zielgene (siehe Abbildung 2). Nach der Bindung des Liganden (z.B. IFN- γ , IL-2 bis -7, IL-10 bis -13 oder Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, PDGF) an seinen spezifischen Rezeptor, erfolgt eine Dimerisierung der Rezeptoreinzelketten. Durch Rezeptorassoziation werden zytosolische

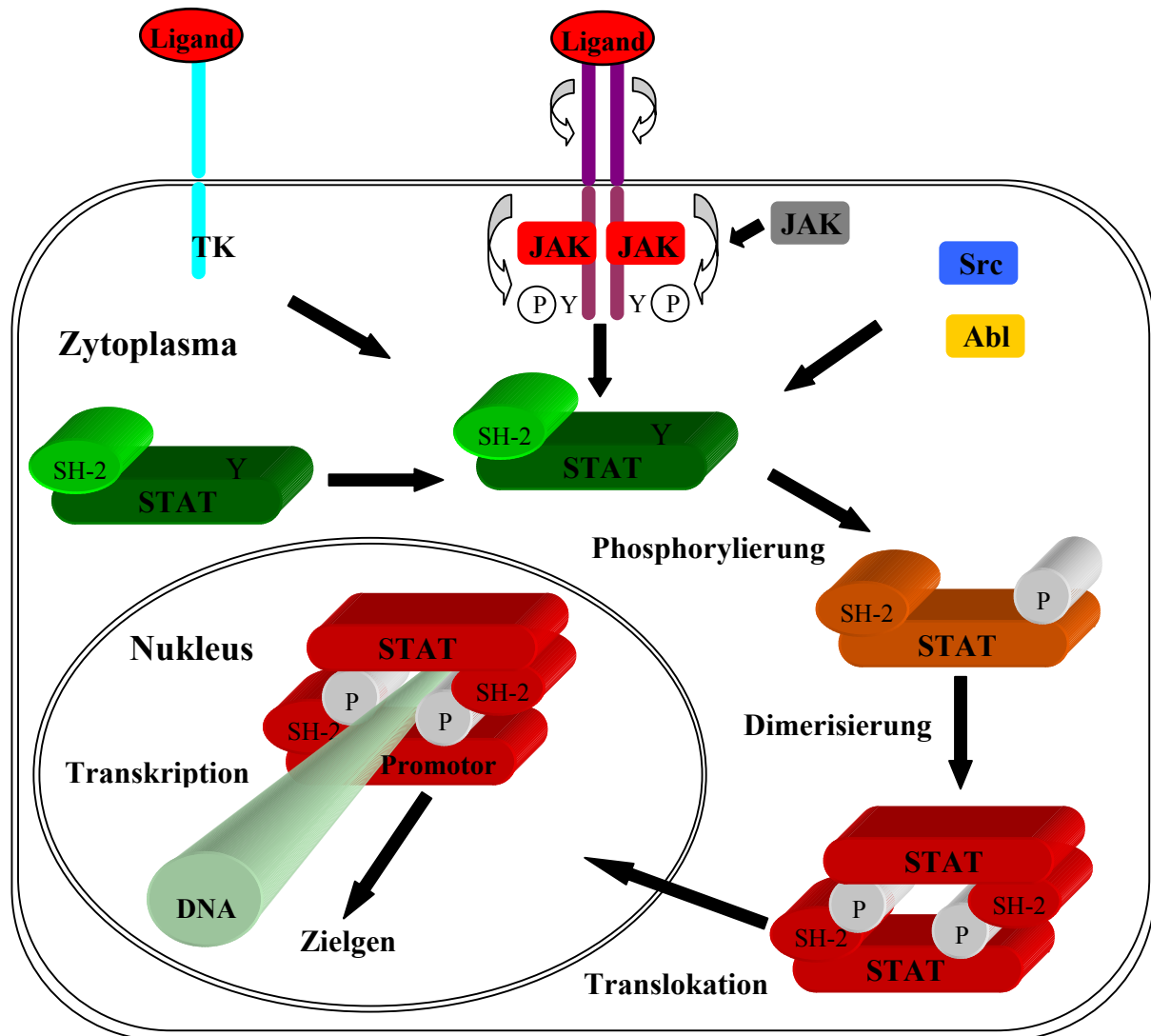


Abb.2 Die Aktivierung des JAK/STAT Weges

Ein kaskadenartiger Prozeß, der über die Tyrosinphosphorylierung von STAT-Proteinen durch Kinasen zur Dimerisierung und Kerntranslokation führt, so daß STATs DNA binden und bestimmte Zielgene aktivieren. (TK Tyrosinkinase, P Tyrosinphosphorylierung) Src, Abl Zytoplasmatische Tyrosinkinasen

Januskinasen (JAK) aktiviert. Sie phosphorylieren sich und mehrere bestimmte intrazelluläre Domänen des Rezeptors, vor allem an der STAT-Bindungsstelle (*Signal transducer and activator of transcription*) (Gadina et al. 2001). Dies ermöglicht die Bindung von STAT-

Proteinen an den Rezeptor (Shuai et al. 1994). Die JAKs phosphorylieren ihren C-terminalen Tyrosinrest (Yeh und Pellegrini 1999), dissoziieren vom Rezeptor und bilden über das Phosphotyrosin und die SH-2 (Src Homology 2) Domäne Homo- oder Heterodimere (Vinkemeier et al. 1996). Die dimerisierten STAT-Moleküle translozieren in den Zellkern, um an spezifische Promotorregionen zu binden und die jeweiligen Zielgene zu aktivieren (Gadina et al. 2001). Die Anzahl der typischen Zielgene des STAT-Signalwegs ist groß, zu ihnen gehören beispielsweise c-myc, bcl-xl, cyclin D1, bcl-2 und VEGF (Bromberg 2001). Den jeweiligen STAT-Dimeren konnten charakteristische DNA-Bindungsmotive zugewiesen werden, die in einer Vielzahl von Promotorregionen wiedergefunden wurden. Alle Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie erkennen Bindungselemente vom Typ TTCN3-4GAA. Systematische Studien konnten bestimmte Präferenzen der individuellen STATs für distinkte Versionen des Consensus-Bindungsmotivs zeigen (Schindler et al. 1995).

Bis heute sind vier verschiedene Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2) bekannt. Das strukturelle Merkmal einer inaktiven Pseudokinasedomäne wurde für sie namensgebend. JAKs gehen über den N-Terminus die Bindung mit Zytokinrezeptoren ein (Gadina et al. 2001, Hoey und Schindler 1998).

Neben den Zytokinen können auch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, PDGF, HGF oder VEGF über Rezeptorproteinkinasen STATs aktivieren (Schaper et al. 1997, Vignais et al. 1996, Wei et al. 2003, Leaman et al. 1996). Eine rezeptorunabhängige STAT-Phosphorylierung ist durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie Abl oder Src möglich (Bowman et al. 2000, Cao et al. 1996, Danial et al. 1995).

2.2.3 Kinetik und Regulation

Von der Bindung des Liganden bis zum Start der Transkription benötigt der JAK/STAT-Weg weniger als 15 Minuten und erreicht bereits nach 30 Minuten das Maximum seiner Aktivität (Ihle et al. 1996). Verglichen mit anderen Signalwegen (z.B. Wnt) handelt es sich um einen sehr schnellen und unkomplizierten Prozeß. Dauer und Intensität der STAT-Aktivierung werden durch mannigfaltige Mechanismen reguliert. Hierzu gehören zum einen die Dephosphorylierung über nukleäre Phosphatasen (Aoki und Matsuda 2002, ten Hoeve et al. 2002, Yamamoto et al. 2002), zum anderen die klassischen Degradierungsprozesse nach Ubiquitinylierung (Hoey und Schindler 1998, Yasukawa et al. 2000). Auch durch die Inaktivierung von Zytokinrezeptoren und Januskinasen durch Phosphatasen, wie SHP-1, SHP-2 oder CD45 wird die Aktivität der STAT-Familie moduliert (Irie-Sasaki et al. 2001). Des weiteren existieren hemmende Mechanismen im Sinne eines negativen Feedbacks, wobei

STAT-Proteine spezifische Inhibitoren wie z.B. CIS-1 (Cytokine Inducible SH-2-domain Containing Protein) oder SOCS1, -2 und -3 (Suppressors of Cytokine Signalling) aktivieren (Chen et al. 2000, Yasukawa et al. 2000). Diese wirken durch Inhibition der Januskinasen, durch Blockade der Phosphorylierung von Zytokinrezeptoren oder durch Förderung der Ubiquitinylierung. Auf Ebene der STAT-DNA-Interaktion wurden die sogenannten PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) beschrieben (Chung et al. 1997). Zudem können auch die natürlichen Splicevarianten der STATs ihre Aktivität vermindern und modulieren (Ward et al. 2000).

Die Transkriptionsaktivität einiger STATs kann zusätzlich durch Serinphosphorylierung verstärkt aber auch vermindert werden (Wen et al. 1995, Jain et al. 1998).

2.2.4 Struktur der STAT-Proteine

Im menschlichen Organismus ist die Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren ubiquitär vertreten. Sie zählt die sieben Mitglieder STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6, aus denen durch alternatives Splicing zusätzliche Varianten gebildet werden können. Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen STAT-Proteinen besteht in der Sequenz der C-terminalen Region. Hier befinden sich die zwei für STAT-Transkriptionsfaktoren charakteristischen strukturellen Merkmale, eine SH-2-Domäne und ein Tyrosinrest, durch deren gegenseitige Interaktion die Dimerisierung vermittelt wird (siehe Abb. 3) (Hoey und Schindler 1998). Auch die Bindung an den phosphorylierten Zytokinrezeptor geschieht über die SH-2 Domäne (Heim et al. 1995). Neben der Transaktivierungsdomäne besitzen STAT1, -3, -4 und -5 hier einen Serinrest, der durch Serin/Threonin-Kinasen wie z.B. MAP-Kinasen phosphoryliert wird und bei der Entstehung von Splicevarianten verloren geht (Ramsauer et al. 2002, Decker und Kovarik 2000). Eine SH-3 (Src Homology 3) Domäne vermittelt Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun oder NFκB (Zhang et al. 1999). Die weiter N-terminal gelegenen Strukturen sind für die DNA-Bindung verantwortlich und ermöglichen die Bildung von STAT-Tetrameren (Gadina et al. 2001, Vinkemeier et al. 1996, Moriggl et al. 2005).

2.2.5 STAT-Funktionen

Die physiologischen Aufgaben der STAT-Transkriptionsfaktoren sind sehr vielseitig. Sie regeln essentielle Prozesse bei der Embryogenese und der Immunantwort. Sie kontrollieren Differenzierung, Entwicklung, Regeneration, Proliferation und Apoptose von Zellen (Bowman et al. 2000). Die wichtigsten Funktionen der einzelnen STAT-Proteine zeigten sich nach genetischer Depletion ihrer Gene in *Knockout* Mäusen.

In den letzten Jahren wurde durch die erhöhte STAT1-, STAT3- und STAT5-Aktivität vieler maligner Tumoren die Untersuchung der JAK/STAT vermittelten Signaltransduktion zum Forschungsschwerpunkt von Arbeitsgruppen weltweit. Da der Fokus dieser Arbeit auf STAT3 fällt, werden an dieser Stelle die Funktionen von STAT1 und STAT5 in malignen Tumoren nur sehr kurz gestreift. STAT3 wird in einem eigenen Kapitel detailliert behandelt.

2.2.5.1 STAT5

STAT5 ist essentiell bei der malignen Transformation durch das Philadelphiachromosom Bcr/Abl (Sillaber et al. 2000). Dominant-negativ mutiertes STAT5 hebt den onkogenen Effekt von Bcr/Abl auf (Nieborowska-Skorska et al. 1999). Ähnlich wie STAT3 führt es zur Zellzyklusprogression (Moriggl et al. 1999, Moriggl et al. 2005) und ist bei der Regulation der Apoptose beteiligt (Bromberg 2001).

2.2.5.2 STAT1

Auch STAT1, ein entscheidender Transkriptionsfaktor bei der Wirkung von Interferonen und der Immunantwort gegen Viren (Meraz et al. 1996, Durbin et al. 1996), ist in den Zellen mehrerer Tumoren aktiviert (s. Tabelle 3). Im Vergleich zu STAT3 und STAT5, die fördernd in den Zellzyklus eingreifen, handelt es sich bei STAT1 um einen Tumorsuppressor. Es induziert den Zellzyklusinhibitor p21 und begünstigt durch Expression der Caspase-1 die

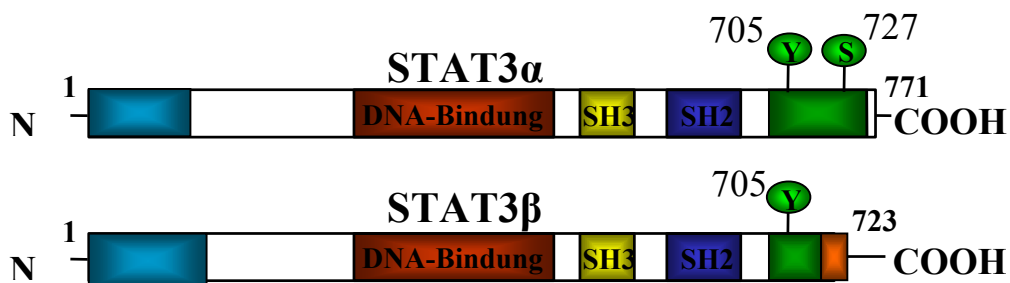


Abb.3 Struktur der STAT-Proteine STAT3 α und STAT3 β

Modifiziert nach R.Moriggl.

Apoptose (Bromberg 2002, Levy und Gilliland 2000, O'Shea et al. 2002). In einer Studie über das Mammakarzinom von Widschwendter und Kollegen konnte gezeigt werden, daß Patientinnen mit STAT1-aktiven Tumoren im Durchschnitt von längerer Rezidivfreiheit und

erhöhtem Gesamtüberleben profitieren (Widschwendter et al. 2002). STAT1-depletierte Mäuse haben eine verminderte Resistenz gegen Viren und zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber karzinogenen Substanzen (Kaplan et al. 1998).

Die Zelllinien vieler Tumoren reagieren jedoch kaum mit einem Rückgang der Proliferation auf eine IFN- γ induzierte STAT1-Aktivierung. Es ist anzunehmen, daß hier die proliferativen Effekte anderer Faktoren überwiegen und der Tumor sich der physiologischen Wirkung von STAT1 entzieht (Bromberg 2001).

2.3 STAT3 - Ein Transkriptionsfaktor mit vielen Gesichtern

STAT3 wurde 1994 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen als wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Induktion der Akuten-Phase-Reaktion in Leberzellen entdeckt (Akira et al. 1994, Zhong et al. 1994). Es ist ein während der Evolution in hohem Maße konserviertes Protein. Der Unterschied zwischen humanem und murinem STAT3 liegt bei nur einer Aminosäure (Glutamat 760 zu Aspartat) (Pietra et al. 1998). Man unterscheidet drei Isoformen: STAT3 α mit einem molekularen Gewicht von 92 kDa und seine zwei Splicevarianten STAT3 β mit 83 kDa und STAT3 γ mit 72 kDa (Akira et al. 1994, Hevehan et al. 2002).

Zur Aktivierung von STAT3 sind mehrere Mechanismen bekannt. Neben vielen Zytokinen (z.B. IL-6, OSM, LIF und IL-11) aktivieren auch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, PDGF, HGF oder VEGF über Rezeptorproteinkinasen STAT3 (Schaper et al. 1997, Vignais et al. 1996, Wei et al. 2003, Leaman et al. 1996). Eine rezeptorunabhängige STAT3-Phosphorylierung ist durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie Abl oder Src möglich (Bowman et al. 2000, Cao et al. 1996, Danial et al. 1995). Obwohl es durch JAK1, JAK2 und Tyk2 phosphoryliert werden kann, wird es bevorzugt durch JAK1 aktiviert (Guschin et al. 1995).

In Abhängigkeit des Zielgewebes kann STAT3 α Proliferation, Differenzierung, den programmierten Zelltod und das Überleben von Zellen in entscheidendem Maße beeinflussen (Levy und Lee 2002). Pluripotente embryonale Stammzellen benötigen zur Selbsterneuerung das STAT3 aktivierende Zytokin LIF (*Leukaemia Inducing Factor*). Exprimiert man dominant negative Varianten von STAT3, z.B. durch die Mutation des Tyrosin 705 zu Phenylalanin (d.n. STAT3), in Stammzellen, so verhindert dies die Zellteilung und führt zur Differenzierung der Zellen (Niwa et al. 1998, Raz et al. 1999). STAT3 ist das einzige Mitglied der STAT Familie, dessen *Knockout* Mäuse nicht lebensfähig sind und 7,5 Tage nach ihrer Zeugung sterben. Das viszerale Endoderm kann sich zu diesem Zeitpunkt nicht entwickeln (Takeda et al. 1997). Auch in humanen Trophoblasten konnte aktiviertes STAT3 gefunden werden. Es ist daher wahrscheinlich, daß STAT3 während der Entwicklung und für die Funktion der Plazenta eine Rolle spielt (Corvinus et al. 2003).

Eine autologe Knochenmarktransplantation nach vorheriger Transfektion mit dominant negativem STAT3 führte in Mäusen zu zehnfach niedrigeren Leukozytenkonzentrationen im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrollgruppe (Oh und Eaves 2002). Unter Zellkulturbedingungen konnte gezeigt werden, daß STAT3 über Liganden des gp130-Rezeptors durch die erhöhte Expression von cyclin D2, D3, A und cdc25A, aber auch durch

das Herunterregulieren von p21 und p27 zur Progression des Zellzyklus von der G- zu S-Phase führt (Fukada et al. 1998).

Der Einfluß auf den Zellzyklus durch STAT3 ist jedoch vom Entwicklungsstadium und Gewebetyp abhängig. Im Gewebe der Brustdrüse aktiviert STAT3 den programmierten Zelltod und führt nach Depletion zur verzögerten Involution (Chapman et al. 1999). In Keratozyten und bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Zebrafischmodell konnte STAT3 eine entscheidende Kontrollfunktion bei der Zellmigration zugewiesen werden (Sano et al. 1999, Yamashita et al. 2002). Bei der IL-6 induzierten Akute-Phase-Reaktion ist STAT3 der entscheidende Transkriptionsfaktor bei der Synthese von Akute-Phase-Proteine in der Leber (Alonzi et al. 2001, Heinrich et al. 1998).

Aufgrund der frühen embryonalen Letalität der STAT3^{-/-} Mäuse wurde die Rolle von STAT3 durch gezielte, gewebespezifische Deletion, ein sogenannter konditioneller *Knockout*, erforscht (siehe Tabelle 3).

| STAT3-depletiertes Gewebe | Phänotyp | Funktionsstörung | Referenz |
|--------------------------------|--|------------------------------|---|
| Keratozyten | beeinträchtigt Haarwachstum / Wundheilung | Migration | (Takeda et al. 1997, Sano et al. 1999) |
| Thymusepithel | Thymushypoplasie | Überleben | (Sano et al. 2001) |
| T- Lymphozyten | beeinträchtigte IL-6 abhängige Proliferation / IL-2R α Expression | Überleben / Proliferation | (Akaishi et al. 1998) |
| Neutrophile / Monozyten | verstärkte Entzündungsreaktion / Th1 Differenzierung / chronische Kolitis | | (Takeda et al. 1999) |
| Mammaepithel | verzögerte Involution | Apoptose | (Chapman et al. 1999) |
| Hepatozyten | beeinträchtigte Akute-Phase- Reaktion | Genexpression | (Alonzi et al. 2001) |
| Sensorische Neurone | verstärkte neuronale Apoptose | Überleben | (Alonzi et al. 2001) |
| Motorneurone | Zelluntergang nach Nervenschädigung | Überleben | (Schweizer et al. 2002) |

Tabelle 1 STAT3-defiziente Phänotypen nach konditionellem Knockout
Modifiziert nach (Levy und Lee 2002)

2.3.1 Die Splicevarianten

STAT3 β (siehe Abb. 3) wurde ursprünglich als synergistischer Interaktionspartner von c-jun, einem Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie, bei der Aktivierung des α 2-Makroglobulin-Promotors entdeckt (Schaefer et al. 1995). Die mRNA ist am C-Terminus um 50 Basenpaare

verkürzt. Durch Verschiebung des Leserahmens entstehen am C-Terminus 7 neue Aminosäuren. Der phosphorylierbare Serinrest 727 und die Transaktivierungsdomäne gehen hierbei verloren (Caldenhoven et al. 1996, Shao et al. 2001). Das Profil der aktivierenden Liganden gleicht STAT3 α . STAT3 β wird jedoch bevorzugt phosphoryliert, besitzt eine höhere DNA-Affinität und dimerisiert bevorzugt als Heterodimer mit stabilerer Bindung (Yoo et al. 2002, Caldenhoven et al. 1996, Park et al. 2000). Da es die Aktivierung von STAT3-Zielgenen während der Transformation durch das Src-Onkoprotein vermindert, wurde es als dominant negatives Regulatorprotein von STAT3 α beschrieben (Caldenhoven et al. 1996, Turkson et al. 1998). Besonders deutlich wird die Rolle der negativen Transkriptionskontrolle von STAT3 β während der Akuten-Phase-Reaktion nach konditioneller Inaktivierung in der Leber. Diese Mäuse reagieren auf einen septischen Schock mit einer Überreaktion und erholen sich kaum (Yoo et al. 2002). Erstaunlicherweise konnte die Arbeitsgruppe von V. Poli 2004 zeigen, daß die Expression von STAT3 β die STAT3 α -Knockout-Mäuse vor dem frühen embryonalen Tod retten kann und daher lebenswichtige STAT3-Zielgene aktiviert (Maritano et al. 2004). Man geht daher davon aus, daß es sich um eine Isoform mit stärkerer DNA-Bindungsaktivität und verringertem Transaktivierungspotential handelt. Es ist in der Lage, die Funktion von STAT3 α zu hemmen, aber die Transkription von STAT3-Genen auf niedrigerem Niveau fortzuführen.

STAT3 γ verliert durch das Splicing am C-Terminus das Tyrosin 705. Die Dimerisierung mit anderen STATs ist daher nicht möglich. Die Rezeptorbindung über die erhaltene SH-2 Domäne konnte jedoch gezeigt werden. Die physiologische Rolle bleibt bis heute unklar (Hevehan et al. 2002).

2.3.2 STAT3 und Onkogenese

Der Verlust über die Kontrolle der proliferativen Eigenschaften eines Gewebes ist ein entscheidendes Charakteristikum maligner Entartung. Dies geschieht durch eine gestörte Balance zwischen Zellwachstum, der Zellzykluskontrolle und dem programmierten Zelltod (Apoptose) (Hanahan und Weinberg 2000). Tumorzellen erlangen hierbei durch konstitutive Aktivierung intrazellulärer Signalwege Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (Blume-Jensen und Hunter 2001). Besonders für STAT3 konnte bei der Entstehung und dem Fortschreiten maligner Neoplasien eine Schlüsselrolle nachgewiesen werden. Im Vergleich zur schnellen, meist transienten Kommunikation über den JAK/STAT-Weg während der physiologischen Prozesse eines gesunden Organismus ist seine konstitutive Aktivität zunehmend mit der malignen Transformation von Zellen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, daß STATs die Tumorphysiologie hinsichtlich Proliferation, Entdifferenzierung, Infiltration

und Metastasierung in erheblichem Maße beeinflussen (Bowman et al. 2000, Bromberg 2001, Bromberg 2002). In einer Vielzahl von Tumoren, wie z.B. dem Mammakarzinom, Ovarialkarzinomen, Chorionkarzinom, Malignen Melanomen, Kopf- und Hals-Karzinom oder Hirntumoren, konnte eine konstitutive STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden (s. Tabelle 2) Eine direkte STAT-aktivierende Mutation konnte in der Natur bis heute nicht gefunden werden (Burke et al. 2001).

Es wurde eine breite Variation komplexer Mechanismen der STAT3-Aktivierung in Tumoren gefunden. Zu diesen gehören autokrine Schleifen. Zellen des multiplen Myeloms überexprimieren IL-6 und den IL-6-Rezeptor (Jelinek et al. 1997). Erhöhte Expression von EGF und IL-6 sowie ihrer Rezeptoren findet man im Kopf- und Hals-Karzinom (Sriuranpong et al. 2003). Ähnliche Mechanismen sind auch im Mammakarzinom, Mesothelium und Prostatakarzinom beschrieben worden (Karunagaran et al. 1996, Langerak et al. 1996, Qiu et al. 1998).

STAT3 unterliegt im gesunden Organismus der strengen Kontrolle seiner Inhibitoren (s.o.). Yoshikawa et al. konnten zeigen, daß das Versagen von Kontrollmechanismen wie z.B. durch SOCS1 im hepatozellulären Karzinom oder PIAS in Lymphomen zur konstitutiven STAT3-Aktivierung führt (Yoshikawa et al. 2001, Zhang et al. 2002).

Eine bedeutende Rolle spielt STAT3 bei der Entstehung maligner hämatopoetischer Erkrankungen (Rane und Reddy 2002). STAT3 und auch STAT5 sind wichtige Ziele bei der Transformation durch Fusionsproteine mit Kinaseaktivität wie z.B. Bcr/Abl (das Transkriptionsprodukt des Philadelphiachromosoms), Tel/JAK2, Tel/PDGFβR, Tel/Abl oder durch virale Onkogene wie v-abl (Spiekermann et al. 2002). Die konstitutive Kinaseaktivität von Tel/JAK2 entsteht durch Translokation zwischen der Kinasedomäne von JAK2 auf Chromosom 9 und der Oligomerisationsdomäne des Tel Transkriptionsfaktors auf Chromosom 12. Man findet sie vor allem bei der AML (Ho et al. 1999). Es überrascht daher nicht, daß aktiviertes STAT3 in einer Vielzahl hämatopoetischer Neoplasien wie z.B. CML, B-CLL, T-CLL, AML, ALL, Burkitt Lymphom etc. gefunden wurde (s.Tabelle 2) (Epling-Burnette et al. 2001, Gouilleux-Gruart et al. 1996, Weber-Nordt et al. 1996, Zamo et al. 2002).

| Tumor | STAT | Referenz | STAT | Referenz |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| <u>Solide:</u> | <u>Primärtumore:</u> | | <u>Zelllinien:</u> | |
| Mammakarzinom | 1,3 | (Watson und Miller 1995) | 3 | (Garcia et al. 1997) |
| Kopf- u. Hals-Karzinom | 1,3 | (Grandis et al. 1998) | 3 | (Grandis et al. 1998) |
| Prostatakarzinom | 3 | (Campbell et al. 2001) | 3 | (Ni et al. 2000) |
| Malignes Melanom | 3 | (Florenes et al. 1999) | 3 | (Fontaine et al. 1998) |
| Ovarialkarzinom | 3 | (Syed et al. 2002) | 3 | (Huang et al. 2000) |
| Bronchialkarzinom | 1,3 | (Seki et al. 2004) | 3 | (Fernandes et al. 1999) |
| Tumoren des ZNS | 1,3 | (Schaefer et al. 2002) | | (Schaefer et al. 2000) |
| Pankreaskarzinom | 3 | (Zhu und Emerson 2002) | 3 | (Wang et al. 1998) |
| Nierenzellkarzinom | 3 | (Horiguchi et al. 2002) | 3 | (Horiguchi et al. 2002) |
| Kolorektales Karzinom | 1,3 | | | |
| <u>Flüssig:</u> | | | | |
| CML | 5 | (Chai et al. 1997) | | (Shuai et al. 1996) |
| AML | 1,3,5 | (Weber-Nordt et al. 1996) | 1,3,5 | (Weber-Nordt et al. 1996) |
| CLL | 1,3 | (Frank et al. 1997) | 1,3 | (Frank et al. 1997) |
| Mycosis fungoides | 3 | (Nielsen et al. 1997) | 3 | (Nielsen et al. 1997) |
| Burkitt Lymphom | 3 | (Weber-Nordt et al. 1996) | 3 | (Weber-Nordt et al. 1996) |
| Multiples Myelom | 3 | (Catlett-Falcone et al. 1999) | 3 | (Catlett-Falcone et al. 1999) |
| Hodgkin Lymphom | 3,6 | (Skinnider et al. 2002) | 3,6 | (Kube et al. 2001) |
| ALL | 1,3 | (Gouilleux-Gruart et al. 1996) | 1,3 | (Gouilleux-Gruart et al. 1996) |

Tabelle 2 STAT3-Aktivität in verschiedenen Tumorerkrankungen

(Modifiziert nach Bowman 2000)

Die entscheidende Rolle von STAT3 bei der Transformation von Fibroblasten konnte durch die Überexpression von STAT3 β oder dominant negativen Konstrukten belegt werden (Bromberg et al. 1998, Turkson et al. 1998) und beruht vor allem auf der erhöhten Transkription des c-myc Gens (Kiuchi et al. 1999).

Für STAT3 wurde auch eine negativ regulierende Wirkung auf den programmierten Zelltod beschrieben. In Kooperation mit c-jun suppremiert STAT3 α die Expression des Fas-Todesrezeptors, der nach Bindung des Fas- Liganden den programmierten Zelltod induziert. Die Expression von STAT3 β und dominant negativem STAT3 in Tumorzellen führt zur erhöhten Apoptoserate durch den Fas-Liganden (Ivanov et al. 2001, Ivanov et al. 2002).

Den direkten Beweis der transformierenden Potenz von STAT3 erbrachten 1999 Bromberg und Darnell. Sie substituierten zwei Aminosäuren der SH-2 Domäne durch Cystein und erhielten hierdurch den über Sulfidbrücken dauerhaft dimerisierten Transkriptionsfaktor „c.a. STAT3“, der dauerhaft im Zellkern lokalisiert werden konnte und an DNA bindet. Sie konnten zeigen, daß im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle c.a. STAT3 transfizierte Fibroblasten nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse Tumoren entwickeln (Bromberg et al. 1999). Fibroblasten, die mit dem konstitutiv aktiven STAT3 transfiziert wurden, wachen verankerungsunabhängig in Soft Agar und in serumfreien Medium. Sie haben eine erhöhte Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose durch UV-Strahlung und Cytostatika, wie z.B. Cyclohexamid und Aktinomycin D. Das konstitutiv aktive STAT3 antagonisiert die proapoptotischen Effekte von STAT1 (Shen et al. 2001).

Bromberg und Darnell proklamierten 1999 aufgrund der direkten Tumortransformation von Zellen durch die konstitutiv aktive Variante STAT3 als onkogenes Protein (Bromberg et al. 1999). Eine Vielzahl von Publikationen zeigt, daß STAT3 ein wichtiger malignitätsvermittelnder Faktor während der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren sein kann. Da bis heute nur sehr wenig über die Aktivität und Funktion von STAT3 im kolorektalen Karzinom bekannt ist, wird sich diese Arbeit diesem Thema widmen.

3. Ziele der Arbeit

Bestimmung der Expression und der Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 im Gewebe kolorektaler Tumoren im Vergleich zum nicht-neoplastisch veränderten Gewebe des Tumorrandes

Immunhistologische Beurteilung der Lokalisation von aktiviertem STAT3 im Tumor- und Randgewebe des kolorektalen Karzinoms

Untersuchung verschiedener Kolonkarzinomzelllinien hinsichtlich STAT3-Aktivierung

Stabile Expression von funktionell unterschiedlichen STAT3-Varianten in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms zur modellhaften Evaluierung der STAT3-Funktion im kolorektalen Karzinom

Beurteilung eines STAT3-Einflusses auf das Wachstum des kolorektalen Karzinoms anhand von Karzinomzelllinien im Proliferationsassay und Mausmodell

Suche nach möglichen Wegen einer STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom

Abschätzung einer potentiellen klinischen Relevanz der STAT3-Aktivität in Bezug auf Diagnostik, Prognose und Therapieentwicklung

4. Material und Methoden

4.1 *Herstellernachweis*

| | |
|--|---|
| Acrylamid, Rotiphorese Gel 30 | Carl Roth GmbH & Co KG |
| [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, 3000 Ci/mmol | Hartmann |
| Benchmark molecular-weight standard | GIBCO BRL |
| BIOMax AR Film | Kodak Company, Rochester |
| Bromphenolblau, Ficoll | Fluka |
| BSA-buffer 10× | New England BioLabs |
| ECL-Kit | NEN Life Science, Brüssel |
| ECL-Röntgenfilme | Amersham Pharmacia Biotech |
| EGF | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Elektrophoresekammern (groß) | Zentralwerkstatt Klinikum FSU-Jena |
| Dimethylsulfoxid | Sigma Chemicals |
| DC-Protein-Assay-Kit | BioRad, Laboratories GmbH, München |
| Fetales Kälberserum | Greiner GmbH |
| Gentamycin | GIBCO BRL |
| Gelatine | Serva research grade #22151 |
| Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäuse | Harlan |
| Hyperfilm TM ECL TM | Amersham Pharmacia Biotech |
| IL-11 | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Interferon- γ | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Interleukin 6 | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Kulturflaschen | Greiner Labortechnik |
| Leukemia inhibitory factor | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Mikro-Dismembrator | B.Braun, Biotech International GmbH, (Melsungen) |
| Mikrospin6 Columns | Biorad |
| Nitrocellulose –Blotmembran | Schleicher&Schüll GmbH, Keene N.H |
| NP-40 | Serva, Heidelberg |
| Onkostat M | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Poly dI-dC | Roche |

| | |
|------------------------------------|---|
| Polynukleotidkinase | Roche |
| Polyprene | Sigma |
| Proliferationstest | Cell Titer 86 [®] A _{queous} One Solution, Prommega |
| Proteaseinhibitor complete Mini | Roche |
| Protein-Ladder, prestained | Sigma Chemicals |
| RPMI 1640 mit Glutamin | Life Technologies, Inc. |
| SIEm67 | Roche |
| SDS-7B Marker | Sigma |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma Chemicals |
| Transfer-Pads (Bodenpolierscheibe) | Obi Heimwerkerfachmarkt |
| Tris-HCl | Sigma Chemicals |
| Triton X-100 | Sigma Chemicals |
| Trypsin-EDTA 1× | BIOCHROM |
| VEGF | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Westernblot-Kammer | Zentralwerkstatt Klinikum FSU-Jena |

4.2 Antikörper

| Antikörper | Wb | EMSA | Immunhistologie | Referenz | Typ, Herkunft | Epitop, Zielmolekül |
|-------------------------------------|---------|-----------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| α -STAT1 (M22) | 1:1000 | 1 μ l | | Santa Cruz Biotechnology | Kaninchen-IgG | Stat1 α/β C-Terminus |
| α -STAT3 (c-20) | 1:1000 | 1 μ l | 1:50 | Santa Cruz Biotechnology | Kaninchen-IgG | Stat3 α C-Terminus |
| α -STAT3 (H190) | 1:1000 | 1 μ l | | Santa Cruz Biotechnology | Kaninchen-IgG | Stat3 α/β N-Terminus |
| α -phospho-Tyr- 705-STAT3 | 1:1000 | | | New England BioLabs | Kaninchen-IgG | phospho-Stat3 (Tyr 705) |
| α -rabbit IgG- POD | 1:15000 | | | New England BioLabs | Ziegen-IgG- POD-gekoppelt | |

4.3 Gewebeproben

Nach Zustimmung der Ethikkommission waren 17 am kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten der Klinik für Viszeralchirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena während der Tumorresektion Gewebeproben aus dem Tumorzentrum sowie dem angrenzenden nicht-neoplastisch veränderten Gewebe entnommen und zügig kryokonserviert worden.

Die Gewebeproben von Primärtumoren, aus denen die Zelllinien CoGa1, CoGa2 und CoGa3 entwickelt wurden, stellte K. Zatloukal, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Graz, zur Verfügung. Hierbei wurden histologisch exakt definierte Regionen des Tumors mit einem Kryotom aus Gefrierblöcken geschnitten. Aus den jeweiligen Regionen wurde zur Orientierung ein Gefrierschnitt in Methylenblaufärbung angefertigt.

4.4 Zelllinien und Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden mehrere kolorektale Karzinomzelllinien unterschiedlicher Differenzierung verwendet (Leibovitz et al. 1976, Vécsey-Semjén et al. 2002):

| Zelllinie | CoGa1 | CoGa2 | CoGa3 | CoGa12 | HT-29 |
|------------------------------|---|--------------|------------------|------------------|----------------------|
| Patient | | | | | |
| Alter | 64 | 47 | 75 | 74 | 44 |
| Geschlecht | weiblich | männlich | weiblich | weiblich | weiblich |
| Vorerkrankungen | Endometriumkarzinom Nierenzellkarzinom | keine | keine | keine | |
| Genetische Stabilität | MIN | CIN | CIN | CIN | |
| Karyotyp | 46,XX | 58-63,XY | 51-52,XX | 47-50,XX | 68-72,XXX |
| Tumorstadium | pT3,N0,M0, R0 | pT3,N1,Mx,R0 | pT3,N1,Mx, R0 | pT3,N1,Mx, R0 | |
| Tumorgrad | G2-3 | G3 | G3 | G3 | |
| Mutationen | | | | | |
| K-ras | - | + | - | - | + |
| p53 | - | + | - | - | + |
| APC | + | + | - | + | + |
| E-Cadherin | - | - | + | - | - |
| Besonderheiten | HNPCC | | | | DSMZ Nr.: ACC 313 |

Während CoGa1-Zellen morphologische Eigenschaften von hochdifferenzierten malignen Tumoren aufweisen (flächenhaft, epithelial, einschichtig wachsend, hohe Kontaktinhibition), zeigen HT29- und CoGa12-Zellen Eigenschaften von hoch- bis mäßiggradig differenzierten Karzinomen. Diese Zellen zeigen eine polarisierte Morphologie und wachsen teilweise mehrschichtig mit geringer Kontaktinhibition. CoGa2- und CoGa3-Zellen haben Eigenschaften von geringgradiger Differenzierung. Die Zellen sind abgerundet und zeigen keinerlei Polarität; es besteht keine Kontaktinhibition.

4.4.1 Kultivierungsbedingungen

Alle Zellen wurden bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37 °C in Gewebekulturflaschen (Nunc) kultiviert. Passagierung und Mediumwechsel waren je nach Zelldichte alle 2-5 Tage notwendig. Es wurden folgende Kulturmedien verwendet:

HT-29-Zellen - RPMI 1640, 10% FKS, Gentamycin 100 µg/ml

CoGa-Zellen - RPMI 1640, 10% FKS, 1% Natriumpyruvat, Gentamycin 100 µg/ml .

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS in Trypsin (Biochrom AG) bei RT in 2-5 min abgelöst, in Kompletmedium übernommen, anschließend bei 1000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert, nach Absaugen des Überstands in frisches Medium überführt und aufgeteilt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert, abzentrifugiert und mit Einfriermedium versetzt, anschließend in Kryoröhrchen (Nunc) überführt und nach einer Vorinkubation bei –80°C (für 2 Wochen) in Flüssigstickstoff gelagert. Das Einfriermedium bestand aus RPMI 1640, 20% FKS, 10% DMSO.

4.4.2 Zytokinstimulationen

Für die Zytokinstimulationen wurden ca. 70% konfluente Zellen, kultiviert in 10 cm-Schalen, verwendet. Vor der Stimulation wurden die Zellen für 15 Stunden serumfrei kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 4 ml zytokinhaltigem Kulturmedium versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min im Brutschrank. Das Stimulationsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit vorgekühltem PBS gespült. Zum Lösen der adhären Zellen wurden 500 µl kaltes PBS auf die Zellen pipettiert und diese mit einem Einmalschaber von der Oberfläche abgetragen. Anschließend wurde die PBS-Zellsuspension in ein Eppendorf-Tube überführt und diese für 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für EMSA-Analysen und Western Blots bei –80°C aufbewahrt.

Folgende Zytokine und Konzentrationen wurden eingesetzt:

20 ng/ml Interleukin-6 (IL-6)

20 ng/ml Onkostatin M (OSM)

20 ng/ml *Leukemia inhibitory factor* (LIF)

20 ng/ml IL-11

20 ng/ml Interferon- γ (IFN- γ)

50 ng/ml *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

40 ng/ml *Epithelial Growth Factor* (EGF)

4.4.3 Virale Transduktion der Zelllinien

Die virale Transduktion der Zelllinien wurde während eines zweiwöchigen Aufenthaltes am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main in Zusammenarbeit mit E. Pfitzner durchgeführt.

Die STAT3-Konstrukte wildtypisches STAT3 (w.t.), konstitutiv aktives STAT3 (c.a.) und das dominant negative STAT3 (d.n.) wurden von F. Döll in den bizistronischen retroviralen Vektor pMX-IRES-GFP kloniert (Liu et al. 1997). Diese Vektoren enthalten neben den verschiedenen STAT3-Konstrukten ein Leseraster für das Fluoreszenz-Protein GFP (Green Fluorescing Protein).

Das Retrovirus wurde aus dem Kulturmedium der Verpackungszelllinie 293GPG gewonnen (Ory et al. 1996). Die Zelllinie wurde hierzu transient mit den retroviralen Vektoren der verschiedenen STAT3-Konstrukte transfiziert. Hierzu wurden 4×10^5 Zellen der Verpackungszelllinie 293DPG auf gelatinebeschichteten 6-Lochplatten ausgesät. Nach einem Tag folgte eine Calciumphosphat-Transfektion für 5 h. Hierbei wurden 5 μ g DNA pro Ansatz transfiziert. Die DNA wurde 120 μ l H₂O suspendiert und für 2 min mit 120 μ l Lösung A inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von 240 μ l Lösung B unter ständigem Vortexen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde das Gemisch dem Medium der Zelllinien beigefügt. Nach 5 h wurden die Zelllinien mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

| | | |
|-----------|-------------------------|------------------|
| Lösung A: | 2,5 M CaCl ₂ | 50 ml |
| | 1 M HEPES | 25 ml |
| | H ₂ O | 175 ml (pH 6,95) |

| | | |
|-----------|--|---------|
| Lösung B: | 1 M HEPES | 25 ml |
| | 5 M NaCl | 28 ml |
| | 0,3 M Na ₂ HPO ₄ | 1,25 ml |
| | 0,3 M NaH ₂ PO ₄ | 1,25 ml |
| | H ₂ O | 445 ml |

Vier Tage nach Transfektion wurde der mit amphotropen Viren angereicherte Zellkulturüberstand der Verpackungszelllinie gefiltert und zur Infektion der Zelllinien CoGa1, CoGa2, CoGa3, CoGa12 und HT-29 verwendet. Hierbei wurden jeweils 1×10^6 Zellen 24 h vor Infektion in 6-Lochplatten ausgesät. Dem retroviralen Überstand wurden 4 µg/ml Polybrene (Sigma) zugesetzt. Die Zellen wurde dreimal für 24 h mit frischem retroviralen Kulturüberstand inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde eine Passage nach Infektion zytometrisch gemessen.

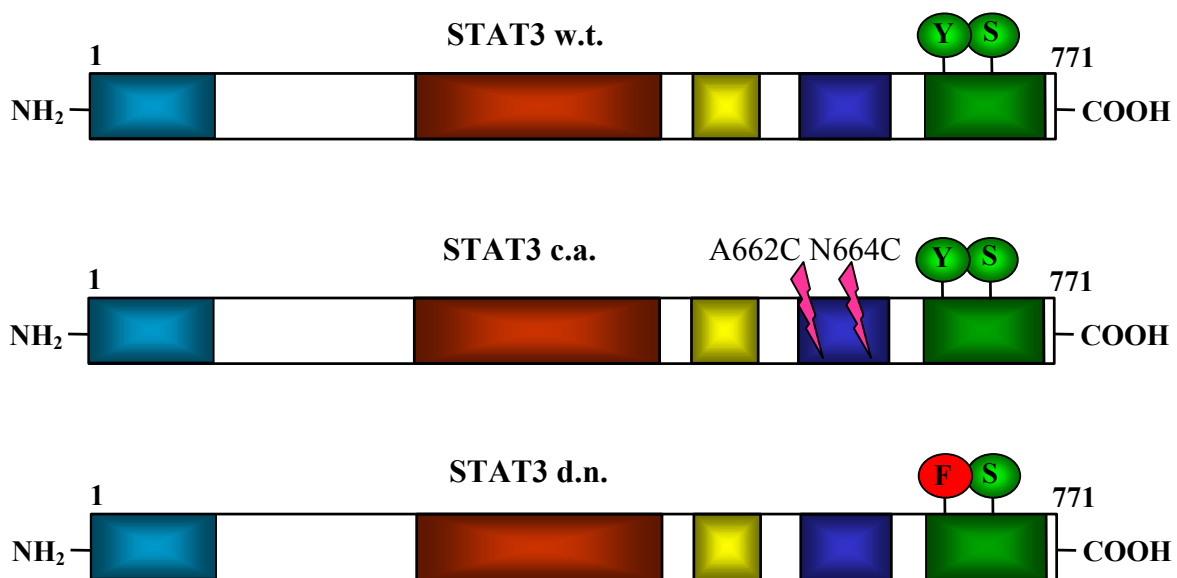


Abb.4 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten unterschiedlichen STAT3-Konstrukte

(Abbildung modifiziert nach R. Moriggl)

Zur Transduktion wurden die in *Abbildung 4* dargestellten STAT3-Konstrukte verwendet. Das konstitutiv aktive STAT3 führt durch den Austausch der Aminosäuren 662 und 664 zu Cystein zu einer spontanen Dimerisierung von STAT3 über die Bildung von Disulfidbrücken. Das dominant negative STAT3 kann durch den Austausch des Tyrosin 705 mit Phenylalanin nicht phosphoryliert werden und dimerisiert daher nicht. Es vermindert die STAT3-Aktivierung durch Verdrängung des endogenen STAT3 von Rezeptoren. Dieses Konstrukt wurde ausschließlich in HT-29-Zellen exprimiert.

4.4.4 Zytometrische Expressionanalysen

Eine Zellkulturpassage nach Transduktion der Zelllinien wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe einer zytometrischen Analyse durchgeführt. Dies wurde durch die GFP-Koexpression des verwendeten retroviralen Vektors pMX-IRES-GFP ermöglicht. Es wurden zwischen 5000-15000 Ereignisse gemessen. Zur Untersuchung wurde das zytometrische Analysegerät FACS Calibur (Becton Dickinson) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Cell Quest Software. In den grafischen Darstellungen wurde die y-Achse (FL-4 Height) mit einem nicht verwendeten Kanal für einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff belegt. Die Zellzahl wurde anhand einer farblichen Abstufung, von grün über rot bis dunkelblau in zunehmender Reihenfolge, kodiert. Die Rahmen wurden anhand der parentalen Zelllinie für die jeweiligen Zell-Derivate kalibriert. Die Transduktionseffizienz in Prozent beschreibt die Anzahl grün-fluoreszierender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

4.4.5 MTS-Proliferationstest

Die Untersuchungen zur Proliferation der verschiedenen Zelllinien wurden mit einem MTS-basierten Verfahren durchgeführt (Cell Titer 86[®] A_{queous} One Solution, Promega). MTS (Dimethylthiazol-Carboxymethoxyphenyl-Sulfonyl-Tetrazolium) wird in Mitochondrien durch Dehydrogenasen in eine photometrisch quantifizierbare Formazanverbindung umgewandelt, die mit der Zellzahl korreliert.

Hierzu wurden für die Zelllinien CoGa1 und HT-29 1×10^3 und für CoGa2, CoGa3 und CoGa12 2×10^3 Zellen in je 50 μ l Medium in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Stimulationen erfolgten mit 20 ng/ml IL-6 bzw. IFN- γ .

Zur Messung wurden 20 μ l der Cell Titer 86[®] A_{queous} One Solution Reagenz je Meßpunkt in das Medium pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 h mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Die Messungen wurden in einem Abstand von 24 Stunden an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Messung zum Zeitpunkt 0 erfolgte fünf Stunden nach der Aussaat der Zellen. Die Daten wurden als ASCII-Datei gespeichert und in Microsoft Excel ausgewertet.

4.4.6 Transplantation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 in Nacktmäuse („Xenografts“)

Insgesamt 10^5 Zellen der unterschiedlich transduzierten Zelllinie HT-29 wurden in einem Volumen von 100 μ l PBS suspendiert und subkutan in den Nacken von 5-8 Wochen alten männlichen athymischen Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäusen (Harlan) injiziert. Die Mäuse wurden nach 2 Monaten bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 2000 mm² getötet. Die gewonnenen Tumorproben wurden wie die kolorektalen Tumorproben weiter für EMSA oder Western Blot aufgearbeitet (siehe unten).

4.5 Zellyse und Gewebeaufschluß

Die 80-90%-konfluenten HT-29-Zellen (10^6 Zellen/ 75 cm²) wurden, nachdem sie mit PBS gewaschen worden sind, direkt mit ca. 500 μ l PBS von der Kulturflaschenoberfläche auf Eis abgeschabt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet lysiert.

Für den Zell- und Gewebeaufschluss der in Flüssigstickstoff gelagerten Patientenproben erfolgte zunächst eine mechanische Grobzerkleinerung auf Trockeneis und unmittelbar darauf eine Zermahlung der Gewebestückchen in einem Mikro-Dismembrator (B.Braun, Biotech International GmbH, Melsungen).

Das auf diese Weise gut pulverisierte Gewebe bzw. das Zellpellet wurde in Abhängigkeit des folgenden Analyseverfahrens (EMSA bzw. Western Blot) mit dem jeweiligen Lysepuffer lysiert.

4.5.1 Zell- und Gewebelysate für EMSA

Zur Durchführung von Electrophoretic Mobility Shiftassays (EMSA) wurden die Zellpellets bzw. das Gewebepulver in WCE-Puffer durch mehrfaches Vortexen gelöst. Die Proben wurden drei- bis viermal hintereinander in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Zwischendurch wurde mehrfach gevortext.

WCE-Puffer: 20 mM Hepes/pH 7,9, 20% Glycerol, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 400 mM NaCl, 5 μ g/ml Leupeptin, 0,2 U/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 5 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF

Die Proben wurden im Anschluß für 30 min bei 4 °C mit 14 000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand abpipetiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

4.5.2 Zell-und Gewebelysate für Western Blots

Für Western Blots wurden die Zellpellets bzw. das Gewebepulver in einem Lysepuffer unter mehrfachem Vortexen gelöst und für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler stark durchgemischt.

Lysepuffer: 25 mM Tris/HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,5% NP-40, 10 mM NaF; 5 mM Na₃VO₄; Proteaseinhibitoren Tablette (Roche)

Die Proben wurden im Anschluß für 30 min bei 4 °C mit 14 000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand abpipetiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

4.6 Arbeiten mit Proteinextrakten

4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Messung von Proteinkonzentrationen wurde nach dem Prinzip von Bradford et al. 1976 durch Extinktionsmessung bei $\lambda=595$ nm mit einem Spekoll200 (Analytik AG, Jena) in Roti^R Quant (ROTH) durchgeführt. Als Standard zum Erstellen einer Eichgerade diente eine BSA-Verdünnungsreihe von 0-20 mg/ml. Je 2 µl einer Probe wurden in Einmal-Kunststoffküvetten pipettiert und vor der Messung 15 min bei RT präinkubiert.

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach dem Auftauen der Lysate wurden je 50 µg pro Probe im Verhältnis 1:3 mit Proteinprobenpuffer versetzt und nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 95 °C und auf einem 7,5%-igem Acrylamid-Gel aufgetragen. Die verwendeten Gele waren 20 cm lang und 3 mm dick.

Die Elektrophoresebedingungen waren: für ein Sammelgel 100 mA/ 50 V (Richtwert 8 V/cm), zum Auftrennen 100 mA/ 200 V (Richtwert 15 V/cm). Als Proteingrößenstandard wurde der SDS-7B-Marker (prestained molecular weight standard mixture) von SIGMA verwendet, der einen Bereich von 200-32 kDa abdeckt.

| | |
|-------------------------------|--|
| 7,5% SDS-Acrylamid Trenngel : | 9,63 ml SDS-Laufpuffer 9,63 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid 19 ml H ₂ O 400 µl 10% APS 20 µl Temed |
| Sammelgel: | 1,25 ml SDS-Sammelgel-Puffer 1,35 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid 7,35 ml H ₂ O 50 µl 10% APS 7 µl Temed |
| SDS-Laufpuffer (5x) | 25 mM Tris/HCl pH 8,6, 950 mM Glycin, 1,5%SDS |
| Proteinprobenpuffer v. Richie | 1 M Tris/HCl pH 6,8, 87%Glycerin, 10% SDS, 2 ml β-Mercaptoethanol (für 40 ml), 0,1% Bromphenolblau, 1 M DTT, 0,1 M Na ₃ VO ₄ |

4.6.3 Western Blot

Gebロットet wurde in einer mit Blotpuffer gefüllten Blotkammer in Sandwich-Technik. Hierbei wurde in eine Halterung zwischen Fiberpads und Filterpapier das Gel (3 mm dick) und die Nitrozellulosemembran eingepaßt. Der Blot wurde unter ständiger Kühlung bei 400 mA, 100 V in 3-4 h durchgeführt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Nitrozellulosemembranen zur Kontrolle des Proteintransfers mit PonceauS gefärbt und die Gele mit Coomassie gegengefärbt. Das Blocken der Membranen, sowie die Antikörperapplikation erfolgten in 1x NETG oder, soweit erwähnt, in 2% BSA-TBST für 4 h- ÜN bei 4 °C; das Waschen entweder in 1x NETG oder 0,2% BSA-TBST.

Zur Detektion wurde der Blockpuffer abgelassen, die Primärantikörperlösung (s. Tabelle) in eine neue Folie eingeschweißt. Unter Rotieren bei 4 °C wurde diese meist über Nacht belassen. Das Abwaschen des Primärantikörpers erfolgte durch 3x Waschen für 5 min in 1x NETG. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in eine neue Folie mit der Sekundärantikörperlösung für 1-2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Abschließend wurde 6x je 5 min mit 1x NETG gewaschen. In der Dunkelkammer wurde die mit den Sekundärantikörpern

konjugierte Peroxidase mittels ECL-Lösung für 20 s in einer Schale aktiviert. Die Membran wurde dann in Saran-Folie eingeschlagen und durch Auflegen eines Films detektiert. Nach Gebrauch wurden die Membranen entweder gestrippt oder bei 4 °C aufbewahrt. Sollte die Membran noch mit anderen Antikörpern detektiert werden, so wurde die Nitrozellulosemembran wie folgt „gestrippt“: Die Membranen wurden in Strip-Puffer B bei 68 °C für 2x 20 min inkubiert, anschließend 10x in PBS bei RT gewaschen und abschließend normal geblockt und detektiert.

Sämtliche Filme wurden mit einem HPScanjet 4470 pro (Hewlett Packard) mit der mitgelieferten Software eingescannt.

| | |
|------------------------------|---|
| NETG (10x) | 1,5 M NaCl; 50 mM EDTA; 500 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5% Triton X-100; 0,2% Gelatine |
| SDS-Transferpuffer v. Richie | (3,5 l) 700 ml Methanol, 11,32 g Glycin, 20,3 g Tris, 6 ml 20%SDS, pH 7,5 |
| Strip-BufferB (1x) | 62,5 mM Tris/HCl, 2%SDS, 10 mM 2-β- Mercaptoethanol, pH 6,7 |

4.6.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Bei der Durchführung des Shift-Assays wurde sich nach dem von Wakao beschriebenen Protokoll (Wakao *et al.*, 1994) gerichtet. Als proteinbindende DNA-Elemente dienen:

| | |
|---|------------------------------|
| <u>SIEm67</u> (bindet Stat1 und Stat3) : | 5`-CATTTCCTCGTAAATC-3` |
| <u>β-casein</u> (bindet Stat1, Stat5a, Stat5b und Stat6): | 5`-AGATTTCTAGGAATTCAATCC-3` |
| <u>AP-1</u> (bindet die Faktoren der AP-1 Familie): | 5`-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA -3` |

Die radioaktive Markierung des 5`-Endes der Oligonukleotide erfolgte mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP in einem 30µl Ansatz:

| |
|---|
| 2µl 10xPNK–buffer (Roche) |
| 2µl Oligos (2,5 pmol/µl) |
| 19µl H ₂ O |
| 1µl PNK (10 units) |
| 6µl [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP 10µCi/µl |

Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Trennung der markierten DNA von freien ungebundenen Oligonukleotiden erfolgte über Microspin6-Chromatographie-Säulen (BIORAD) nach Angaben des Herstellers.

Die radioaktiven DNA-Elemente (8000 cpm/fmol) wurden mit 20µg Gewebe- bzw. Zellextrakt (hergestellt mit Lysispuffer II, siehe oben), 2µl 10×BSA-Puffer (1µg/µl)/ Probe, 1µl Poly-dI-dC (1µg/µl)/ Probe, 4µl 5× Bindungspuffer/ Probe und 11µl Aqua dest./ Probe für 30 min bei RT inkubiert.

5× Gelshiftpuffer: 100 mM Tris base
 5 mM DTT
 1 mM PMSF
 1 mM Glycerol
 250 mM NaCl
 0,5% NP40

Die Proben wurden auf ein 6%-Acrylamid-Gel von 3mm Dicke und einer Länge von 20 cm aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,25×TBE Laufpuffer für 3-4h bei 85 V (1 Gel).

1×TBE-Laufpuffer: 1 M Tris/HCl pH 8,3
 0,83 M Borsäure
 10 mM EDTA

Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier überführt und 1,5-2 h bei 80 °C in einem Vakuumtrockner getrocknet und über Nacht auf Röntgenfilmen bei –80°C exponiert.

Nachweis von STAT-Komplexen mit Antikörpern

Es wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* nach obigen Angaben durchgeführt. Zell- und Gewebeextrakte wurden mit 1-2 µl Antikörperlösung (1-5 µg) versetzt und danach mit den bereits beschriebenen Puffern und der radioaktiven Probe inkubiert.

4.7 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Gewebeschnitte

Die entnommenen Gewebeproben wurden über 24 h in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 5 µm Schnitte entnommen und auf einen Objektträger transferiert. Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinisierung 3 mal für 5 min. in 100% Xylol inkubiert und nachfolgend in einer Ethanolreihe abnehmender Konzentrationen (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) in 2 min Schritten rehydriert und in H₂O überführt.

Die Demaskierung des Antigens erfolgte in 10 mM Natriumcitrat (pH 6,0) durch Autoklavierung bei 121 °C für 20 min. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 30 min in TBS überführt.

Um unspezifische Signale zu reduzieren, wurden Gewebeschnitte für 20 min. mit 3% H₂O₂ behandelt.

Die Inkubation des Primärantikörpers α-Phosphotyrosin-705-STAT3 (Cell Signaling Technology, Beverly MA) erfolgte in einer 1:50 Verdünnung in einem fischgelatinehaltigen Block-Puffer über 24 h bei 4 °C.

Die Detektion erfolgte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper gegen Rabbit-IgG 40 min und anschließend mit 40 min. streptavidinkonjugierter Peroxydase (4plus Universal Immunoperoxidase Detection System, Biocarta Europe). Die Farbentwicklung wurde mit dem Jenchrom Blue Farbstoff (Mobitech, Göttingen) in einer Zeitspanne zwischen 8 und 12 min durchgeführt.

Es folgte die Dehydrierung der Gewebeschnitte in umgekehrter Reihenfolge (siehe oben) und das Eindecken mit Entellan.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiß Axiovert 135M Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Jena) mit einer CF20DXCAir-CCD-Kamera (KAPPA) sowie der mitgelieferten Betriebssoftware angefertigt.

Die Laser-Scanning-Mikroskopien wurden mit einem LSM 310 (Carl Zeiss, Oberkochen, Jena) im Transmissionsmodus mit einem Argon-Ionen-Laser bei einer Wellenlänge von 480 nm durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Objektiv Plan-NEO FLUAR 63x/1,30 für 30 sek. Die Graustufen der erhaltenen Transmissionsbilder wurden invertiert und in rot-grün-blau Bilder mit 3x28 Farben umgewandelt. Die Daten wurden als TIF-File gespeichert und mit dem Adobe Photoshop 5.5 nachbereitet.

| | |
|-----------------------------|---|
| TBS (Tris Buffered Saline): | 50 mM Tris-HCl (pH7,2) 0,65% NaCl |
| Natriumcitrat: | 10mM Natriumcitrat gelöst in H ₂ O |
| Block-Puffer (in TBS): | 1% Fischgelatine 1% Triton 100 |

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchungen der STAT-Aktivität in Tumorbiopsien kolorektaler Karzinompatienten

5.1.1 STAT1- und STAT3-Aktivität im entarteten Gewebe

Zur Evaluierung der STAT-Aktivität im kolorektalen Karzinom wurden operativ gewonnene Gewebeproben aus dem Zentrum des Tumors von 17 Patienten im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) untersucht. Nach Vorbereitung der Proben wurden DNA-Proteinkomplexe elektrophoretisch aufgetrennt. Das mit ^{32}P markierte Oligonukleotid SIEm67 bindet sowohl aktiviertes STAT1 als auch STAT3 (Wagner et al. 1990). STAT1 und STAT3 enthaltende Komplexe haben unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten nach Bindung an das Oligonukleotid. Daher entspricht der STAT3-DNA-Komplex auf den gezeigten Gelen immer den oben liegenden Banden, gefolgt von der etwas tiefer laufenden STAT1-Bande. Zwischen STAT1 und STAT3 befindet sich eine in der Regel etwas weniger scharfe STAT1/3-Heterodimerbande (persönliche Mitteilung Richard Moriggl) (Zhong et al. 1994).

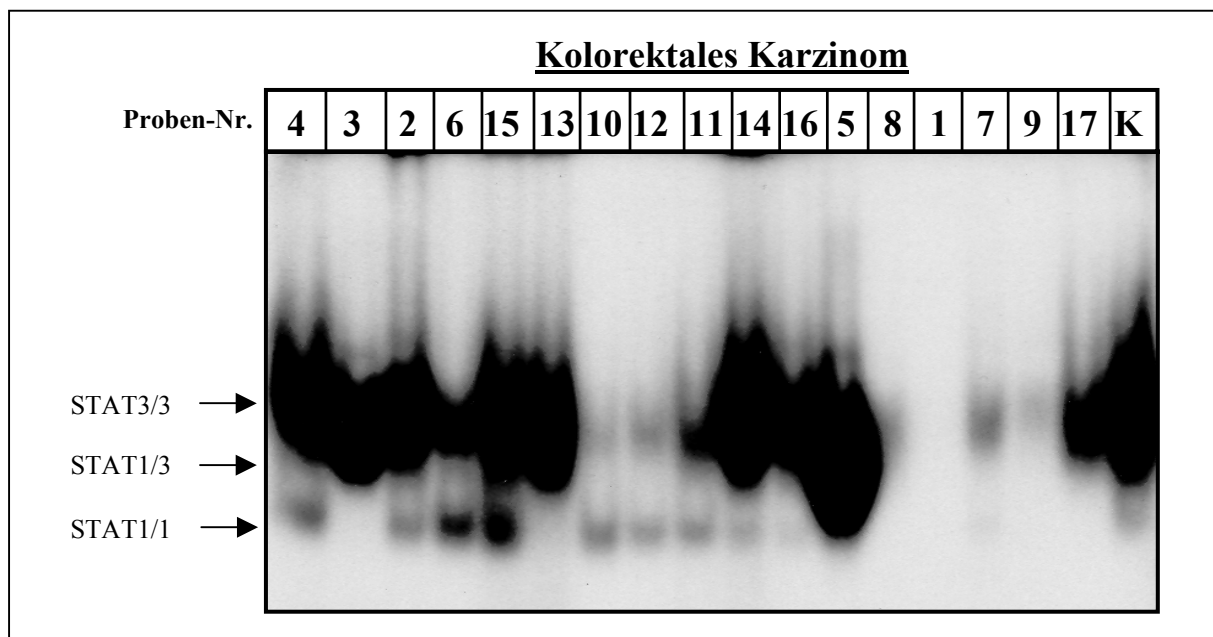


Abb.4 DNA-Bindungsaktivität von STAT3 und STAT1 in kolorektalen Tumoren

Das Tumorgewebe von 17 verschiedenen Patienten wurde mechanisch aufgeschlossen und in WCE-Puffer lysiert. Nach einer Proteinbestimmung wurden je 20 µg der Gewebeextrakte zusammen mit dem STAT1/STAT3-spezifischen ^{32}P -markierten DNA-Bindeelement SIEm67 auf einem nichtdenaturierenden 6%-Acrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Expositionszeit betrug hierbei 24 h. Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurde mit STAT3-aktivierendem IL-6 stimuliert und dient hier als Kontrolle (K). Die einzelnen Komplexe wurden später mit Hilfe von Antikörpern identifiziert (s. Abb.5).

Abbildung 4 (Seite 37) zeigt eine Übersicht der STAT-DNA-Bindungsaktivität von 17 untersuchten kolorektalen Karzinomen. Zur Kontrolle (K) wurde die Zelllinie HT-29 mit IL-6 stimuliert, wodurch bekannterweise STAT3 aktiviert wird (Orth 2003, siehe auch Abb.15). Es fällt auf, daß die Bandenintensitäten zwischen den einzelnen Gewebeproben schwanken, obwohl jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. 11 Tumoren zeigen starke und teilweise sehr starke STAT3-Aktivität, 5 haben eine leichte und ein Tumor (Probe Nummer 1) zeigt keinerlei STAT3-Aktivierung. Probe 5 zeigt eine sehr ausgeprägte STAT-Aktivität und erscheint daher etwas überexponiert. Die STAT1-Aktivität ist im Vergleich zu STAT3 mit 8 von 17 Proben weniger stark ausgeprägt.

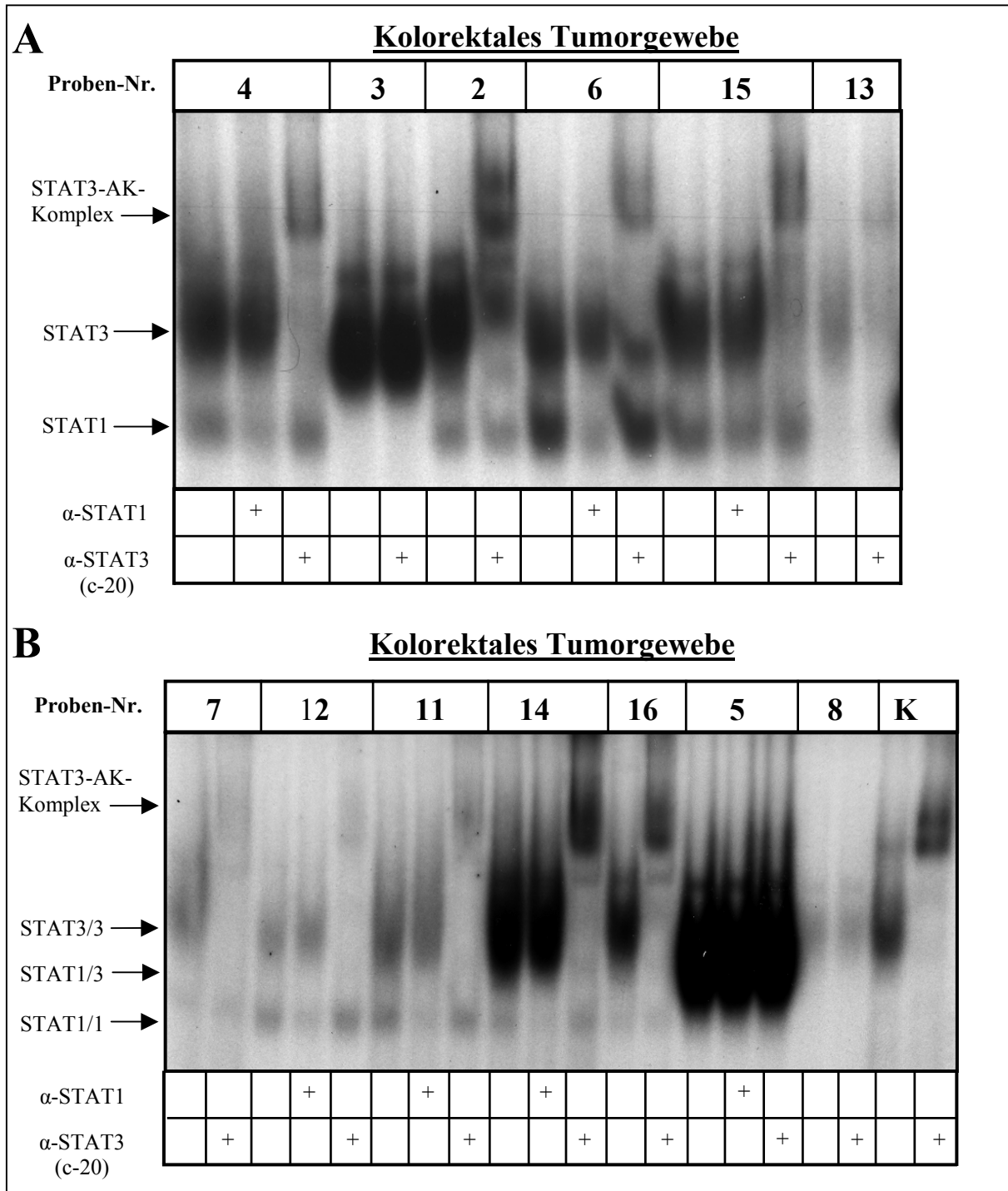


Abb.5 Nachweis der STAT3- und STAT1-DNA-Bindungskomplexe durch spezifische Antikörper

Aus den zuvor in Abb.4 untersuchten Gewebelysaten wurden STAT3-aktivierte Tumorproben mittels EMSA erneut analysiert. Hierbei wurde die Spezifität der Banden mit Antikörpern nachgewiesen. Der STAT3 spezifische Antikörper α -STAT3 c-20 (Santa Cruz) bildet einen STAT3-DNA-Antikörper-Komplex mit verminderter elektrophoretischer Laufgeschwindigkeit. Der verwendete STAT1-Antikörper α -Stat1 (M22 Santa Cruz) stört die Bildung von STAT1-DNA-Komplexen und führt daher während der Elektrophorese zum Verlust dieser Bande. Als Kontrolle (K) wurde wie zuvor die IL-6 stimulierte Kolonkarzinomzelllinie HT-29 verwendet. Die Expositionsdauer betrug für A 48 h und für B 24 h.

Um die Spezifität der zuvor gezeigten Banden zu bestätigen, wurden in *Abbildung 5* (Seite 39) die einzelnen Banden mit Hilfe von Antikörpern charakterisiert. Hierbei kommt es im Fall von STAT3 zur Bildung von STAT-DNA-Antikörper-Komplexen bzw. im Fall von STAT1 zur Verdrängung des Proteins an seiner DNA-Bindungsstelle. Der α -STAT3-Antikörper c-20 (Santa Cruz) verlangsamt durch Bindung an STAT3 die Laufgeschwindigkeit des Komplexes und führt daher zu einer Bande oberhalb der ursprünglichen STAT3-Bande, „Supershift“. Da der α -STAT1-Antikörper M22 (Santa Cruz) die Interaktion zwischen STAT1 und dem Oligonukleotid stört, verschwindet diese Bande. Besonders auffällig ist, daß in den Proben 3, 5 und 8 keine Antikörperbindung nachweisbar ist. Die Banden laufen trotz Zugabe des α -STAT3-Antikörpers auf gleicher Höhe weiter.

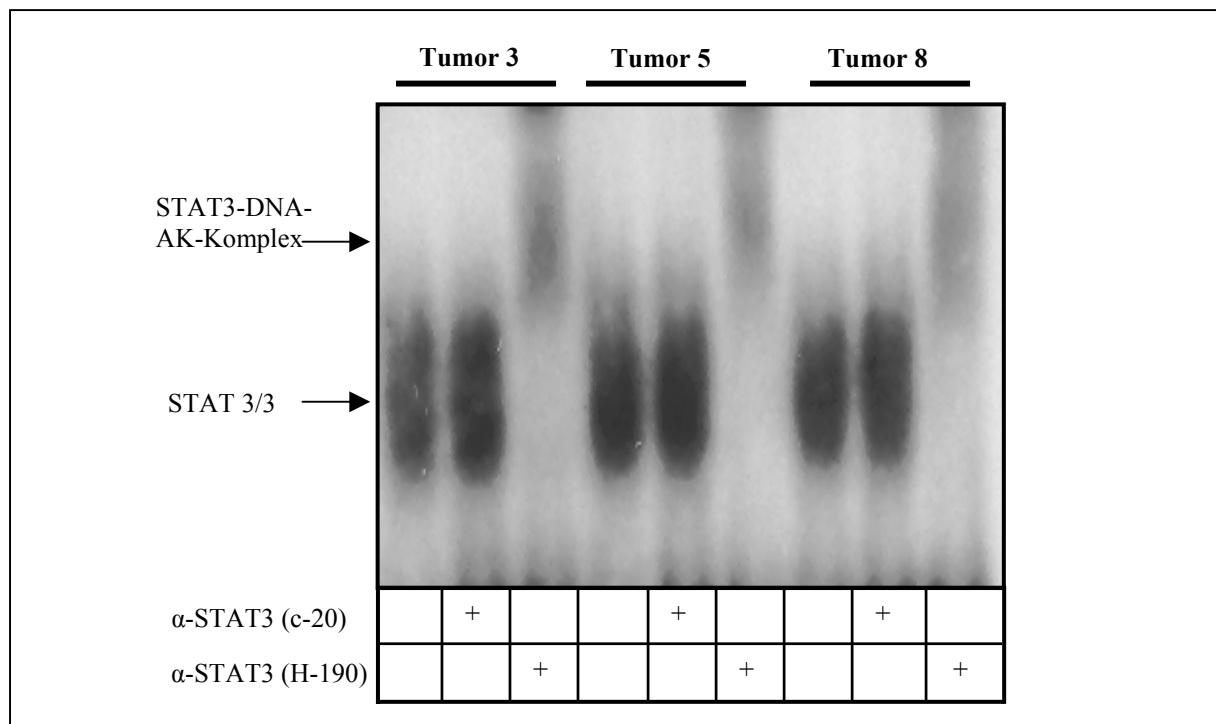


Abb.6 Analyse von STAT3-DNA-Komplexen mit verschiedenen Antikörpern

Die DNA-Bindung an das SIEm67-Bindungselement der Gewebeextrakte von Proben 3, 5 und 8 wurden nochmals genauer untersucht. Neben dem zuvor verwendeten c-20-Antikörper (Santa Cruz), der gegen ein C-terminales STAT3-Epitop gerichtet ist, wurde hier auch der N-terminale STAT3-Antikörper H-190 (Santa Cruz) verwendet.

Um ohne Überexposition alle Proben nebeneinander darstellen zu können, wurde für Probe 8 im Vergleich zu Abb.5 die dreifache Proteinmenge, 60 μ g, verwendet. Die Expositionsdauer betrug 24 h.

Da sich in der zuvor gezeigten Analyse (Abb.5) die Spezifität der STAT3-Komplexe von drei Tumormustern nicht mit dem verwendeten Antikörper nachweisen ließ, wurden diese Proben mit einem weiteren Antikörper untersucht. Der in Abbildung 2 verwendete Antikörper α -STAT3 c-20 (Santa Cruz) ist gegen ein C-terminales Epitop von STAT3 gerichtet und erkennt

ausschließlich STAT3 α (89 kDa). Bei einem Splicevorgang kann STAT3 den C-Terminus verlieren, so daß STAT3 β (80 kDa) entsteht. Dabei geht das antikörperbindende spezifische Epitop verloren (Maritano et al. 2004). Der verwendete c-20 Antikörper kann daher STAT3 β nicht erkennen. Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich bei den konstanten Komplexen der Proben 3, 5 und 8 um diese Splicevariante von STAT3 handelt.

In *Abbildung 6* (Seite 40) wurden daher die Proben 3, 5 und 8 mit dem zuvor verwendeten C-terminalen Antikörper c-20 (Santa Cruz) und dem gegen den N-Terminus von STAT3 gerichteten Antikörper α -STAT3 H190 (Santa Cruz) inkubiert und nebeneinander aufgetragen. Obwohl auch hier der gegen den C-Terminus gerichtete Antikörper die Komplexe nicht identifiziert, bindet der H190-Antikörper in allen drei Tumorseiten an den STAT3-DNA-Komplex. Es handelt sich daher auch hier um eine spezifische STAT3-Bande, deren Ursache wahrscheinlich eine STAT3-Variante ist, die durch alternatives Splicing den C-Terminus verloren hat.

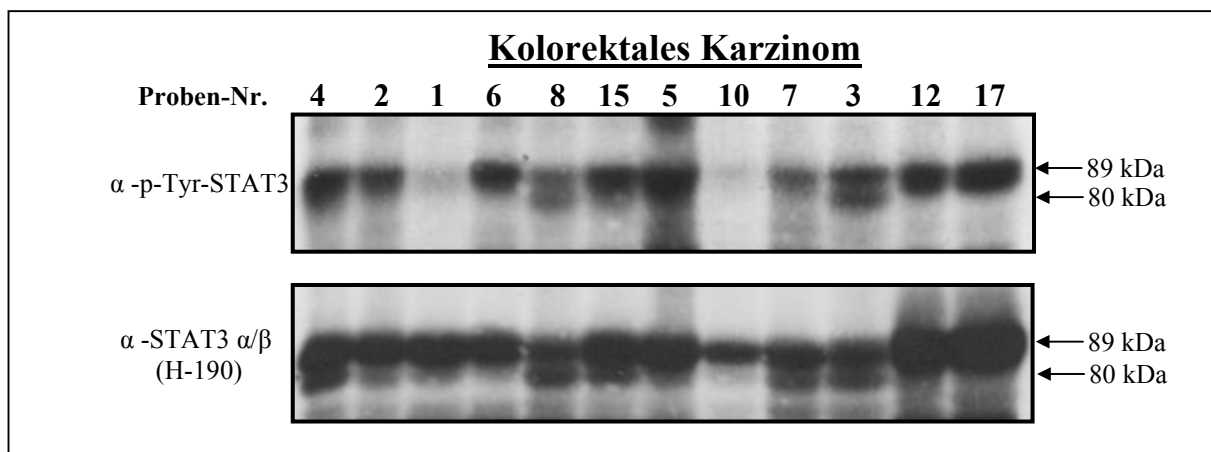


Abb.7 STAT3-Tyrosinphosphorylierung und -Expression im kolorektalen Karzinom

Eine Auswahl der bereits im EMSA analysierten Tumorextrakte (Abb.4 und 5) wurde auf einem 7,5%-igen SDS-Acrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Tyrosin-705-Phosphoryliertes STAT3 (Cell Signaling) analysiert. Dieser erkennt sowohl phosphoryliertes STAT3 α (89 kDa) als auch STAT3 β (80 kDa). Die Inkubationszeit des Primärantikörpers betrug 72 h. Die Expositionszeit der Detektion betrug 1,5 min (siehe auch Material und Methoden).

Die untere Reihe zeigt die STAT3-Expressionskontrolle. Hierzu wurde der Phospho-STAT3-Antikörper mit einer merkptoethanolhaltigen Lösung von der oben gezeigten Membran entfernt (siehe hierzu Material und Methoden). Es erfolgte eine erneute Inkubation mit einem gegen den STAT3-N-Terminus gerichteten Antikörper, α STAT3 H190 (Santa Cruz) (siehe auch Abb.6). Dieser Antikörper erkennt unphosphoryliertes STAT3 α und - β . Die Inkubationszeit betrug 24 h und die Exposition zur Detektion 2 min.

Um den Nachweis der STAT3-Aktivität im kolorektalen Karzinom zu untermauern und eine Aussage über die Expression und Phosphorylierung von STAT3 treffen zu können, wurden 12 der Tumorseiten im Western Blot analysiert (*Abb. 7*). Die durch Detektion mit dem α -

Phospho-Tyr-705-STAT3 Antikörper (Cell Signaling) erzielten Ergebnisse decken sich weitgehend mit dem Aktivitätsnachweis der zuvor gezeigten Shiftassays.

Die Expressionskontrolle wurde mit dem bereits in Abbildung 3 verwendeten N-terminalen Antikörper H190 durchgeführt. H190 ist nicht Phospho-STAT3 spezifisch und erkennt auch unphosphoryliertes STAT3. Um sicherzugehen, daß vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden, war zuvor für alle Gewebeextrakte eine Proteinbestimmung durchgeführt worden. Dies wurde nach dem Blotvorgang auch durch eine Ponceaufärbung bestätigt (nicht gezeigt). Dennoch sind Intensitätsunterschiede der einzelnen STAT3-Banden zu beobachten, was darauf schließen läßt, daß Expressionsunterschiede von STAT3 zwischen den einzelnen Tumoren bestehen.

5.1.2 STAT-Aktivität im angrenzenden Gewebe kolorektaler Karzinome

Da eine ständige Beeinflussung und Wechselwirkung zwischen malignen Tumoren und ihrem umgebenden Gewebe besteht, wurden auch DNA-Bindungsanalysen der jeweils unmittelbar an die Tumoren angrenzenden Gewebe durchgeführt. Dieses Material wurde während der Tumorresektion entnommen.

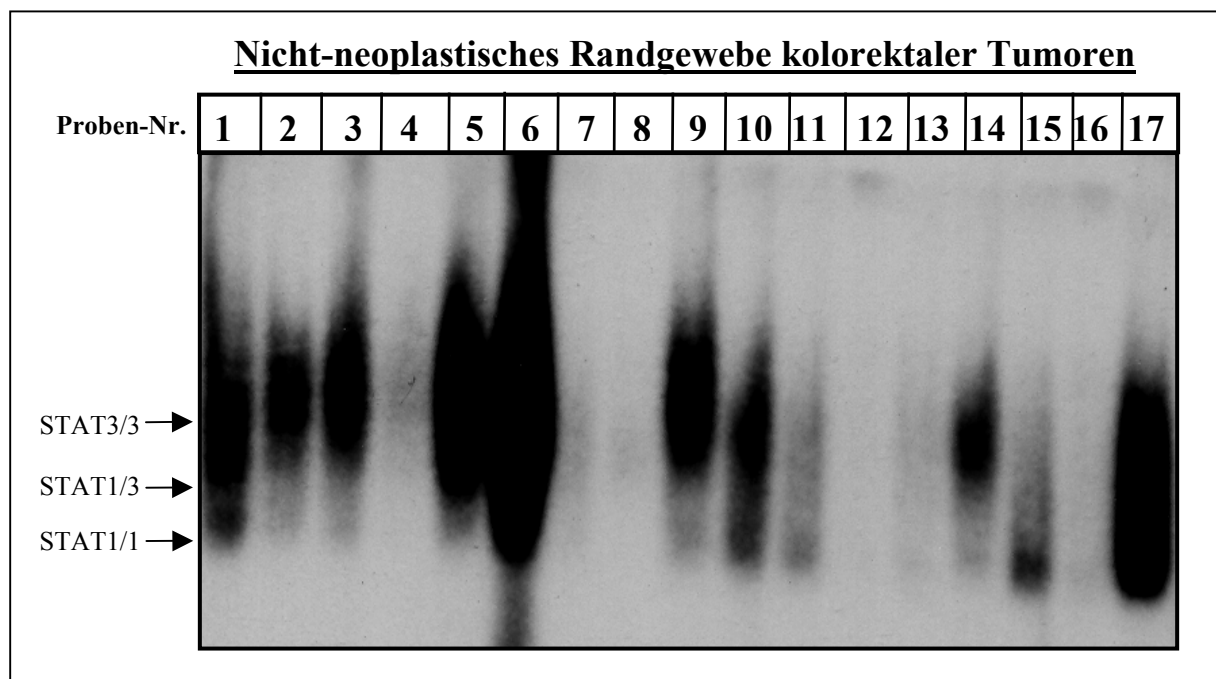


Abb.8 STAT-DNA-Bindungsaktivität im Randgewebe des kolorektalen Karzinoms

Gewebeextrakte des angrenzenden nicht-neoplastischen Randgewebes kolorektaler Tumoren wurden hinsichtlich der DNA-Bindung von STAT3 und STAT1 untersucht. Sie wurden hierzu auf einem 6%-Acrylamid-Gel zusammen mit dem ^{32}P -markierten SIEm67 DNA-Bindeelement elektrophoretisch aufgetrennt (Details siehe Abb.4).

Die einzelnen Komplexe wurden später mit Hilfe von Antikörpern identifiziert (siehe auch Abb.9). Die Expositionsdauer zur Detektion betrug 24 h.

In Analogie zum Tumorgewebe zeigt *Abbildung 8* (Seite 42), daß sich auch in diesem Gewebe sowohl STAT3- als auch STAT1-Aktivität nachweisen läßt. Die Bindungsaktivität der STAT-Proteine ist auch hier unterschiedlich stark ausgeprägt.

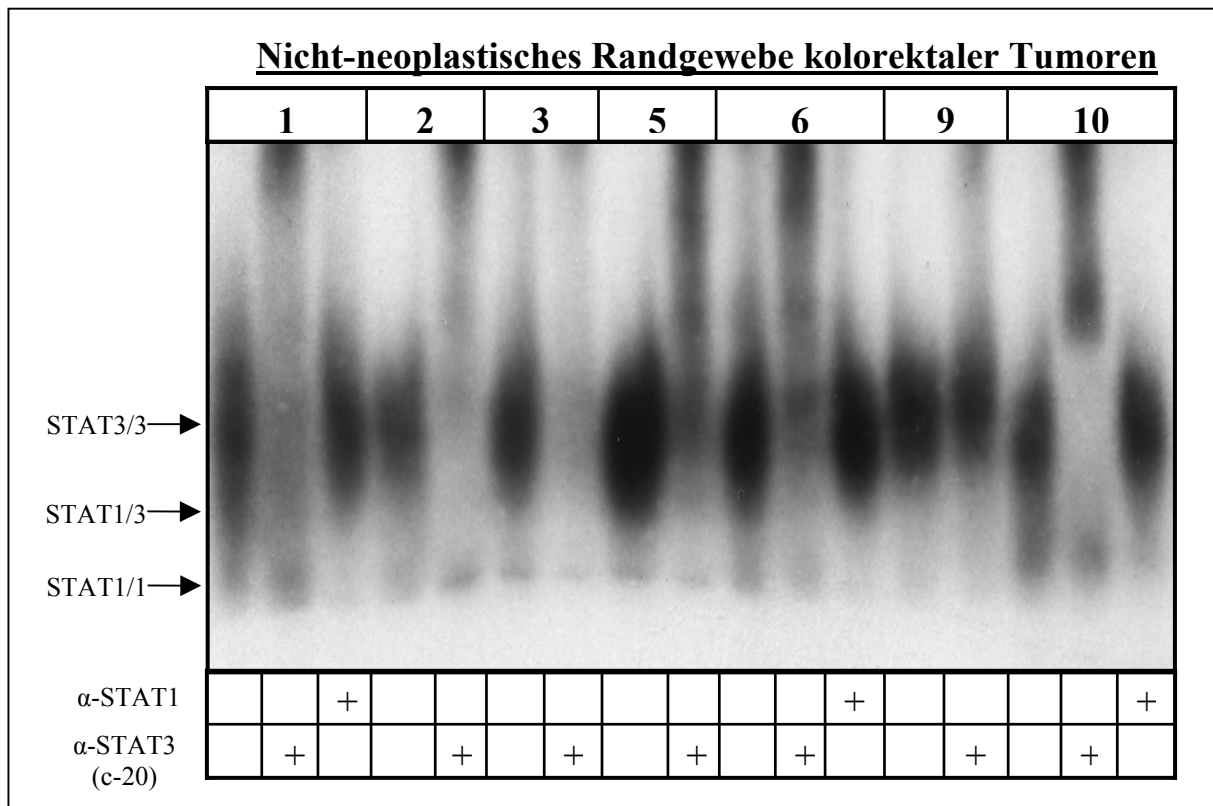


Abb.9 DNA-Bindungsaktivität von STAT3 und STAT1 im Randgewebe des kolorektalen Karzinoms mit Nachweis der STAT1- und STAT3-Komplexe durch spezifische Antikörper

Eine Auswahl der Gewebeextrakte des angrenzenden nicht-neoplastischen Randgewebes wurde hinsichtlich der Bindeaktivität an das SIEm67-Oligonukleotid untersucht. Die Spezifität der STAT-DNA-Bindung wurde, wie in Abb.5, durch die STAT3 bzw. STAT1 spezifischen Antikörper α-STAT3 (c-20 Santa Cruz) und α-STAT1 (M22 Santa Cruz) nachgewiesen.

Die Proteinkonzentration der Probe 6 wurde wegen der starken Intensität um die Hälfte, auf 10 µg reduziert. Die Expositionszeit betrug in diesem Fall 36 h.

Abbildung 9 bestätigt noch einmal die Spezifität der zuvor in *Abbildung 8* gezeigten STAT-Banden durch STAT3- bzw. STAT1-Antikörper (vgl. auch Abb.5).

Vergleicht man die STAT3- und STAT1-Aktivität der Tumorproben in *Abbildung 4* mit ihrer Aktivierung in den zugehörigen Randgeweben (*Abb.8*), lassen sich keine eindeutigen Korrelationen feststellen. So findet sich einerseits in mehreren Proben zwischen Tumor und Randgewebe eine gleichartige STAT3-Bandenintensität (z.B. Probe 3). Andererseits zeigen auch mehrere Proben deutliche Unterschiede der STAT3-Aktivierung in den jeweiligen Gewebetypen (z.B. Probe 1 und 16).

| Probe Nr. | TNM | Grad | Alter | Geschlecht | TU Stat1 | TU Stat3 | RG Stat1 | RG Stat3 | TU Stat5 | TU AP-1 | max. Durchmesser cm | Lokalisation | Bemerkung |
|-----------|------------|------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | T2, N0, M0 | G2 | 44 | m | - | - | ++ | +++ | | - | 1,5 | Sigma | Rezidiv nach adjuvanter CT |
| 2 | T3, N0, M0 | G2 | 80 | m | ++ | +++ | + | +++ | | ++ | 4,3 | Colon ascendens | |
| 3 | T3, N1, M0 | G2 | 82 | w | - | ++++ | + | +++ | | - | 8 | Zokum | Carcinoma mucinosum |
| 4 | T4, N0, M0 | G2 | 33 | w | ++ | +++ | - | + | | + | 8,5 | Colon ascendens | |
| 5 | T2, N0, M0 | G3 | 65 | m | - | +++ | + | ++++ | ++ | +++ | 3,5 | Sigma | |
| 6 | T2, N0, MX | G2 | 73 | w | +++ | ++ | ++ | ++++ | ++ | - | 5,5 | Colon ascendens | |
| 7 | T4, N0, M1 | G2 | 69 | m | - | ++ | - | - | + | +++ | 3,5 | Colon ascendens | hochgradige Stenose |
| 8 | T3, N0, MX | G1-2 | 66 | m | - | + | - | - | | - | 3,5 | Colon ascendens | |
| 9 | T4, N2, M1 | G2 | 64 | w | - | + | + | +++ | | ++ | 6,5 | Colon transversum | Stenosierend |
| 10 | T3, N2, MX | G2 | 50 | w | ++ | + | ++ | +++ | | ++ | 3,7 | Rektum | |
| 11 | T2, N0, M0 | G2 | 67 | m | ++ | ++ | + | + | | - | 4,8 | Rektum | |
| 12 | T3, N0, MX | G2 | 80 | w | ++ | + | - | - | | +++ | 3,5 | Rektum | |
| 13 | T2, N1, MX | G1-2 | 32 | m | - | ++++ | + | + | + | - | 6,5 | Rektum | familiäre Adenomatosis |
| 14 | T3, N0, M0 | G2 | 69 | w | + | ++++ | + | ++ | + | + | 4,6 | Rektum | Z.n. Bestrahlung, Nekrosen |
| 15 | T3, N0, M0 | G2 | 62 | w | +++ | ++++ | ++ | + | | ++ | 5,5 | Rektum | |
| 16 | T3, N0, M0 | G2 | 70 | m | +++ | +++ | - | - | | + | 3,5 | Rektum | |
| 17 | T3, N2, M0 | G2 | 62 | w | - | +++ | +++ | ++++ | + | ++ | 1,4 | Rektum | Carcinoma mucinosum |

Tabelle 5 Zusammenfassung der STAT1-, STAT3-, STAT5- und AP-1-Aktivität im Gewebe kolorektaler Karzinome

17 Tumorproben wurden hinsichtlich der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren in einer DNA-Bindungsanalyse untersucht. Aufgrund der eher seltenen AP-1- und STAT5-Aktivität werden die zugehörigen Gele hier nicht gezeigt. Um einen Vergleich der untersuchten Proben zu ermöglichen, wurden die Intensitäten nach subjektiven Kriterien definiert.

TNM (Einteilung nach UICC) TU (Tumor) RG (Randgewebe) Z.n. (Zustand nach) CT (Chemotherapie)

Tabelle 5 (Seite 44) faßt die ermittelten Ergebnisse der STAT-Aktivitäten in Tumor und Randgewebe zusammen. Neben den Untersuchungen zu STAT1 und STAT3 wurden während dieser Arbeit auch die STAT5-Aktivität und die Bindung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie an ihre jeweilige Konsensus-Bindungssequenz im Tumorgewebe mittels EMSA untersucht (Daten nicht gezeigt, siehe Material und Methoden). Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, da STAT5 in mehreren Tumorerkrankungen konstitutiv aktiviert ist (Bowman et al. 2000) und in der Literatur zwischen Faktoren der AP-1-Familie und STAT3 Interaktionen beschrieben sind. Diese Transkriptionsfaktoren ließen sich jedoch im Vergleich zu STAT3 in sehr viel weniger Tumoren mit meist schwacher Intensität nachweisen. Da auch keine Korrelation zur STAT3-Aktivität zu finden war, wurden diese Befunde im weiteren Verlauf nicht weiterverfolgt.

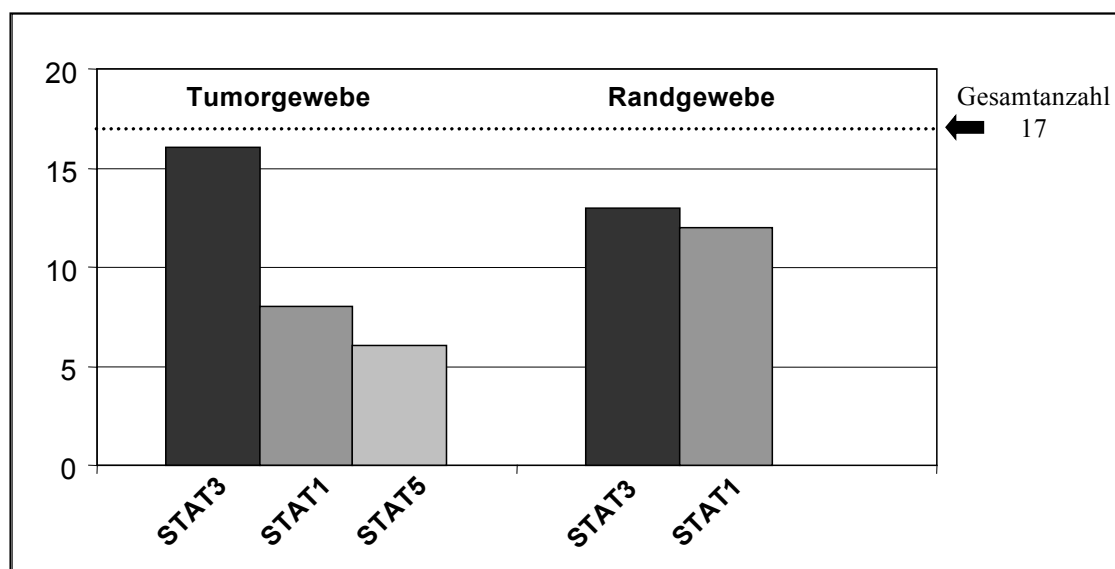


Abb.10 Statistik der Aktivität von STAT3, STAT1 und STAT5 im Tumor- und Randgewebe kolorektaler Karzinome

Die DNA-Bindung der STAT-Proteine wurde im EMSA evaluiert (Abb.4 und 8) und nach ihrer Verteilung auf das Rand- bzw. Tumorgewebe eingeteilt. Eine Analyse der STAT5-Aktivität im Randgewebe wurde nicht durchgeführt.

Ein graphischer Überblick der Verteilung der nachgewiesenen STAT-Aktivitäten auf das Tumor- und Randgewebe ist in *Abbildung 10* dargestellt. Es wurde das Gewebe von insgesamt 17 Patienten untersucht. Das Tumorgewebe zeigte in 16 Fällen STAT3-, in 8 STAT1- und in 6 Fällen STAT5-Aktivität. Im Randgewebe konnte in 13 Fällen STAT3- und in 12 STAT1-DNA-Bindung nachgewiesen werden. Aufgrund der niedrigen Probenanzahl wurde auf eine detailliertere Statistik verzichtet. Eine Korrelation zwischen Tumorstadium und STAT3-Aktivität ließ sich nicht finden.

5.1.3 Immunhistochemische Lokalisation der STAT3-Aktivität in ausgewählten Tumorproben des kolorektalen Karzinoms

Nachdem die STAT3-Aktivität in der Mehrzahl der Gewebeproben belegt war, stellte sich die Frage nach ihrer genauen Lokalisation im Tumor. Das Gewebe maligner Tumoren ist oftmals sehr heterogen und enthält neben den entarteten Epithelzellen auch Bindegewebsstrukturen und Entzündungszellen, in denen ebenfalls STAT3 aktiviert werden kann. Um daher sicher zu gehen, daß die nachgewiesene STAT3-Aktivität tatsächlich in den Tumorzellen vorliegt, wurde phosphoryliertes STAT3 immunhistologisch mit dem bereits im Western Blot (Abb.7) verwendeten Phospho-STAT3-Antikörper nachgewiesen.

Bei den folgenden Abbildungen wurde die untersuchte Region des Tumors im Vorfeld regelmäßig in einer Hämatoxyllin-Eosin (H.E.) Färbung beurteilt. Als Spezifitätskontrolle des Phospho-STAT3-Antikörpers wurde der gleiche Bereich des Gewebes ausschließlich mit dem Sekundärantikörper unter den gleichen experimentellen Bedingungen inkubiert. Alle hier gezeigten Anschnitte wurden aus unmittelbarer Nähe zueinander mit einem Mikrotom in 5 µm Schnitten aus dem Paraffinblock entnommen, so daß H.E. Färbung, Immunhistochemie und Kontrolle in einem Abstand von nur wenigen Mikrometern zueinander liegen.

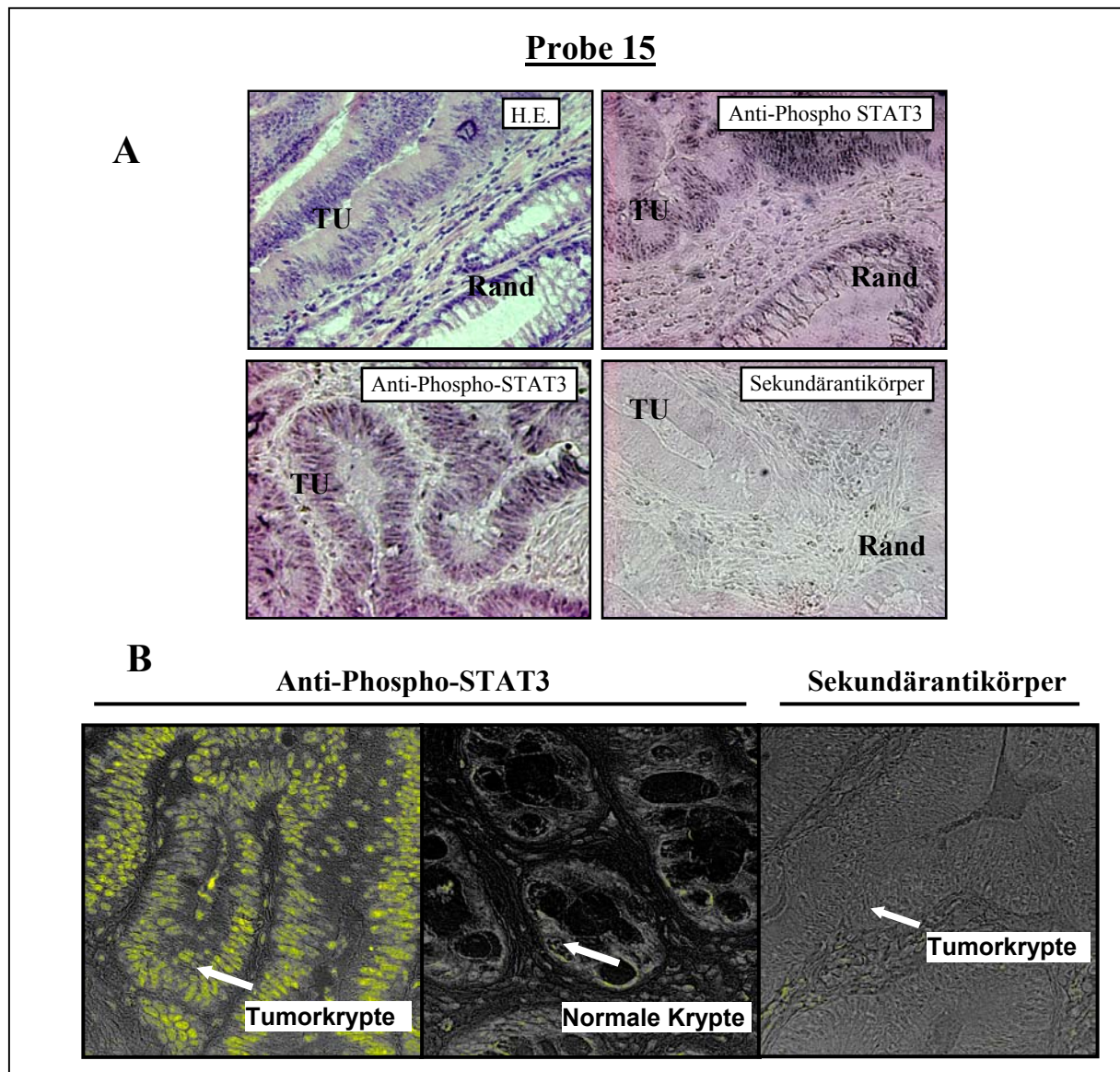


Abb.11 Lichtmikroskopische und lasermikroskopische Darstellung der Probe 15 nach immunhistologischer Untersuchung von Phospho-Tyr-STAT3

A Gezeigt wird die STAT3-Aktivität der Tumorfront aus Probe 15. Hierbei befindet sich dysplastisch entartetes Gewebe in unmittelbarer Nähe zum nicht-neoplastischen Gewebe. Eine Hämatoxyllin-Eosin-Färbung (H.E.) verdeutlicht diese Verhältnisse.

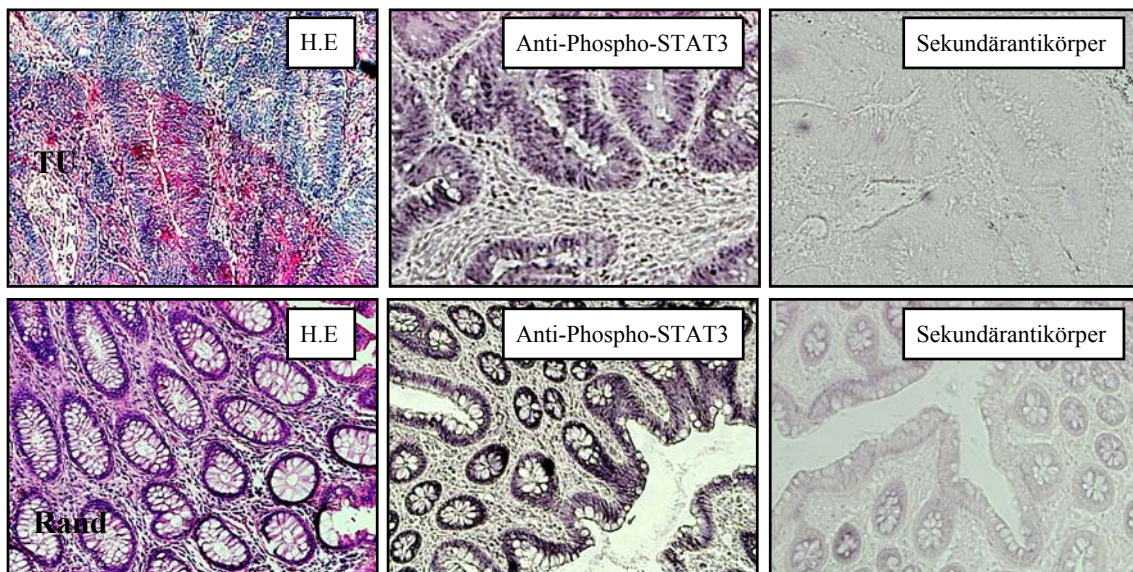
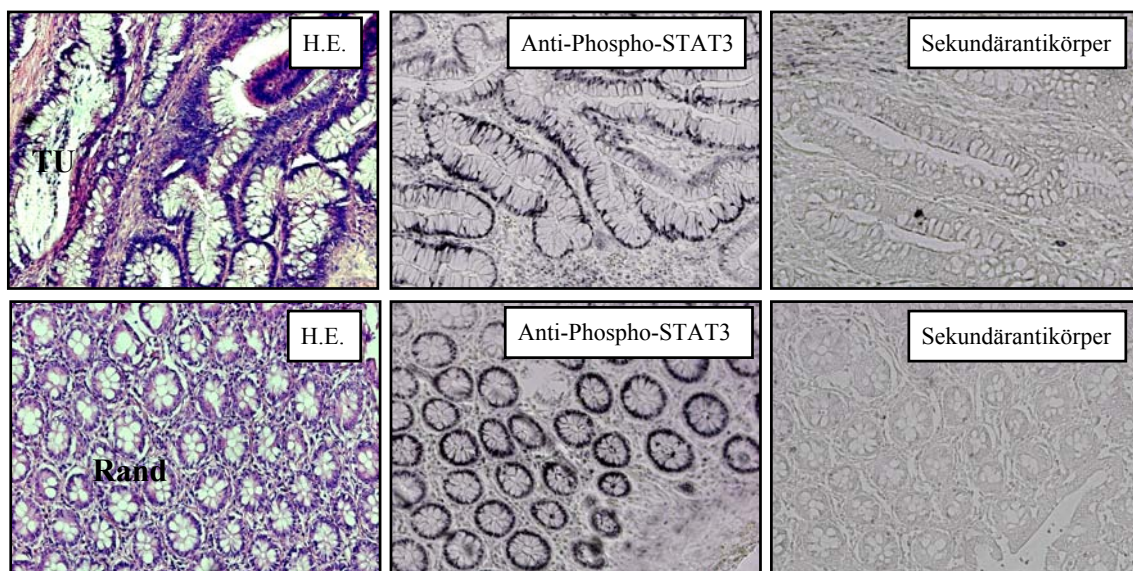
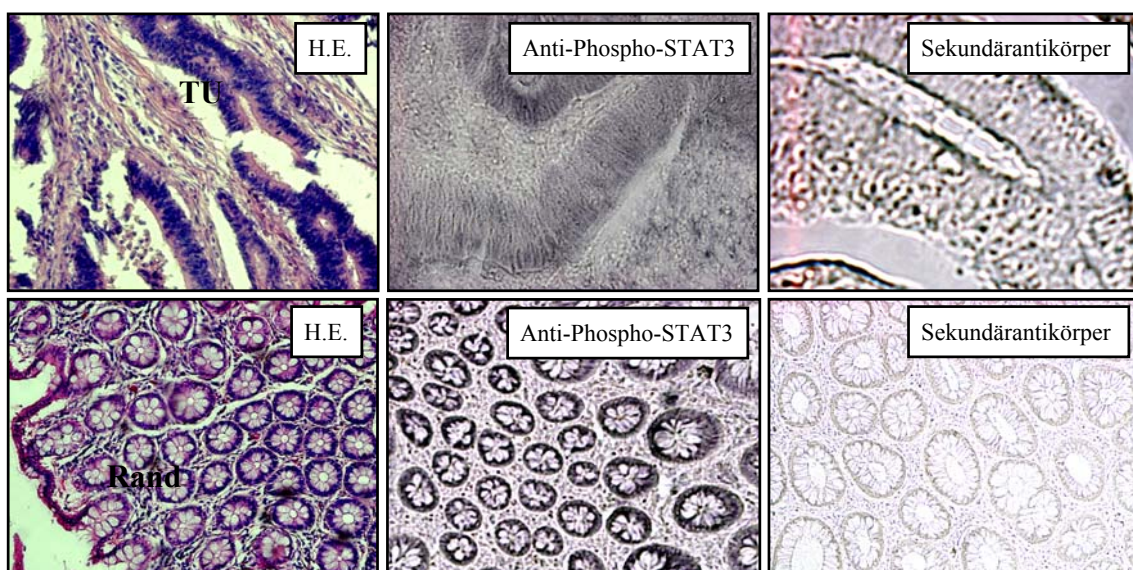
Die Schnitte wurden dem Paraffinblock aus unmittelbarer Nähe zueinander entnommen und mit dem bereits im Western Blot (Abb.7) verwendeten Phosphotyrosin-705-STAT3-Antikörper inkubiert. Die Inkubationszeit für den Primärantikörper betrug 24 h. Zur Detektion wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat verwendet. Die Peroxidase wandelt das Substrat Jenchrom[®] in eine blaue Substanz um. Es wurde hierzu 8 Minuten detektiert. Zur Kontrolle der Spezifität des Signals wurde ohne Primärantikörper das Signal des Sekundärantikörpers evaluiert.

B Die in A immunhistochemisch nachgewiesene STAT3-Aktivität wurde am selben Präparat noch einmal mittels Laserinversionsmikroskopie hervorgehoben. Die Aufnahmen erfolgten bei 400-facher Vergrößerung.

Abbildung 11A zeigt die besonders interessante Situation einer unmittelbaren Nachbarschaft entarteten Gewebes mit angrenzender nicht-neoplastischer Kolonmukosa im angeschnittenen Tumorrand. Der STAT3-Antikörper weist eine deutliche STAT3-Phosphorylierung im

entarteten Gewebe nach, im Bereich der Kernregion des nichtentarteten angrenzenden Gewebes kommt es hingegen zu einem nur sehr schwachen Signal. In der Kontrolle findet sich eine verschwindend geringe unspezifische Signalbildung.

In *Abbildung 11B* wurden die in *7A* gezeigten Anschnitte noch einmal mit der sehr sensitiven Laserinversionsmikroskopie dargestellt. Die erzielten Ergebnisse lokalisieren die STAT3-Phosphorylierung exakt in den entrundeten dysmorphen Kernen des entarteten Darmepithels und weisen so die Kerntranslokation aktivierter STAT3-Dimere nach.

Probe 6**Probe 9****Probe 14**

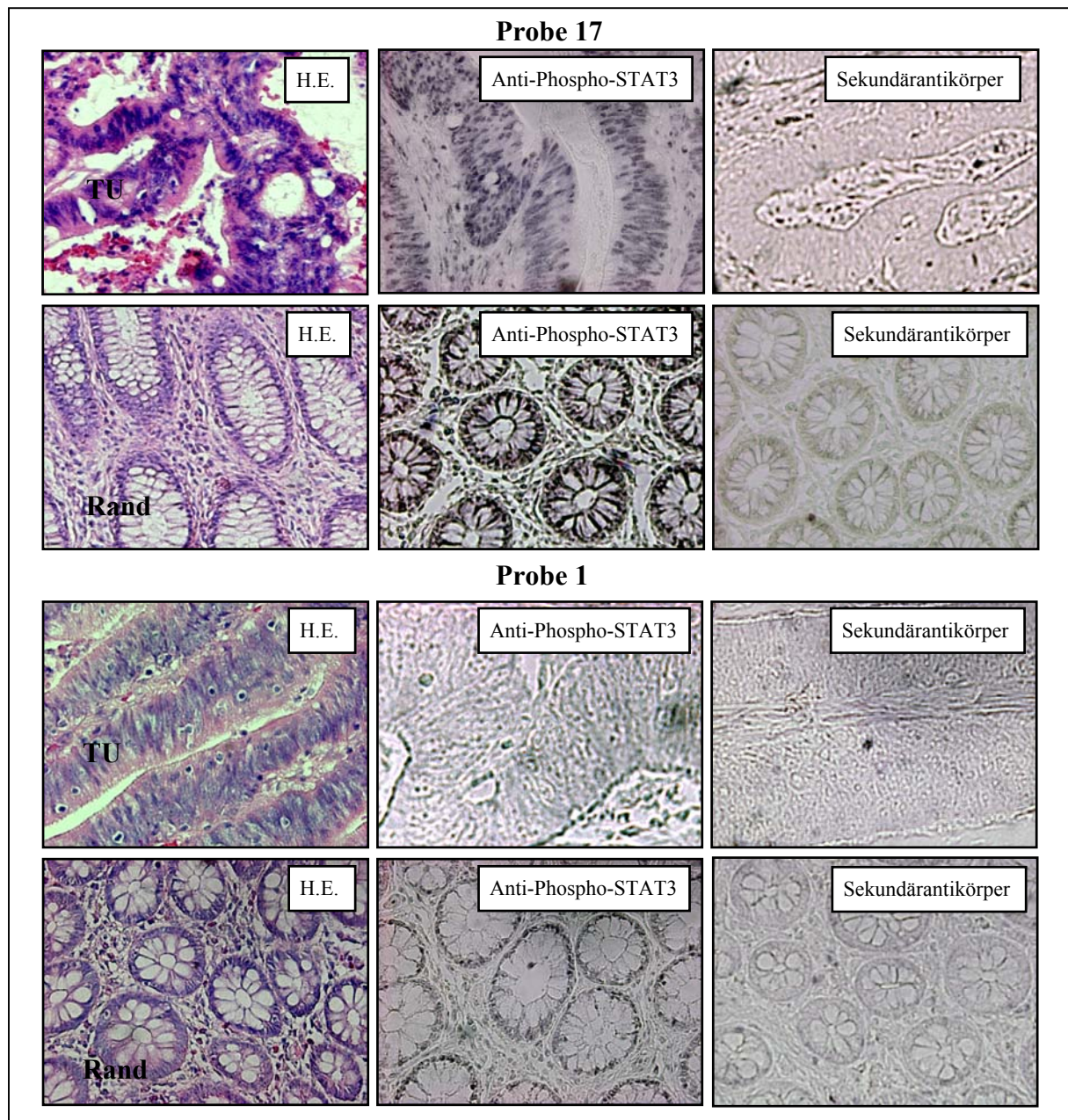


Abb.12 Immunhistochemischer Lokalisation des tyrosinphosphorylierten STAT3 im Tumor- und Randgewebe des kolorektalen Karzinoms

Insgesamt 5 der 17 Patienten wurden immunhistologisch hinsichtlich ihrer STAT3-Aktivität untersucht. Mit Ausnahme von Probe 1 konnte zuvor die STAT3-Aktivität dieser Proben im EMSA und Westernblot gezeigt werden. Der Primärantikörper gegen Tyrosin-705 phosphoryliertes STAT3 wurde für 24 h in einer 1:50 Verdünnung mit den Paraffinschnitten inkubiert. Die Inkubationszeit für den streptavidin konjugierten Sekundärantikörper (Biocarta Europe) betrug 1h. Die Detektion erfolgte mit Jenchrom Blau (Mobictech, Göttingen) für 8 bis 10 Minuten.

Abbildung 12 (Seite 49-50) faßt die immunhistologische Untersuchung der STAT3-Aktivität im Tumor und Randgewebe fünf weiterer Patienten zusammen. Auch hier zeigen sich teilweise unterschiedliche Intensitäten der STAT3-Phosphorylierung zwischen den einzelnen Proben. STAT3 findet sich hauptsächlich in den Kernen entarteter Zellen.

Besonders interessant ist die Tatsache, daß sich auch immunhistochemisch in Probe 1 keine STAT3-Phosphorylierung detektieren läßt. Es konnte weder in den zuvor durchgeführten DNA-Bindungsanalysen (Abb.4) noch im Western Blot (Abb.7) eine STAT3-Aktivität der Probe 1 nachgewiesen werden. Somit dient diese Probe als Negativkontrolle beim immunhistologischen Nachweis von Phospho-STAT3.

Die in den Abbildungen 7 und 8 erzielten Ergebnisse von insgesamt 6 Patienten sind mit den Erkenntnissen aus den zuvor durchgeführten EMSA-Analysen und Western Blots konsistent (siehe Abb.4-9). Die nachgewiesene STAT3-Aktivität hat ihren Ursprung in den epithelialen Zellen des Gewebes. Auch die Anfärbung der Kernregionen bestätigt die Translokation von STAT3-Dimeren in den Zellkern und somit die Transkriptionsaktivität des Faktors.

5.1.4 Analyse der STAT1 und STAT3-Aktivität im primären Tumorgewebe kolorektaler Tumorzelllinien

Um im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Funktion von STAT3 im veränderten Gewebe zu untersuchen, wurden mehrere Zelllinien des kolorektalen Karzinoms in die Untersuchungen einbezogen. Hierzu wurden die von Lukas Huber (Institut für Molekulare Pathologie, Wien) zur Verfügung gestellten CoGa-Zelllinien verwendet (Vécsey-Semjén et al. 2002). Die Besonderheit dieser Zelllinien ist, daß das primäre Tumorgewebe, aus dem sie ursprünglich entwickelt wurden, zur Verfügung stand und somit hinsichtlich STAT3-Aktivität untersucht werden konnte. Da sich diese Zelllinien außerdem in niedriger Passage befanden, konnten weitere Experimente an Zellen durchgeführt werden, die die pathophysiologischen Verhältnisse ihres jeweiligen Tumors relativ gut simulieren.

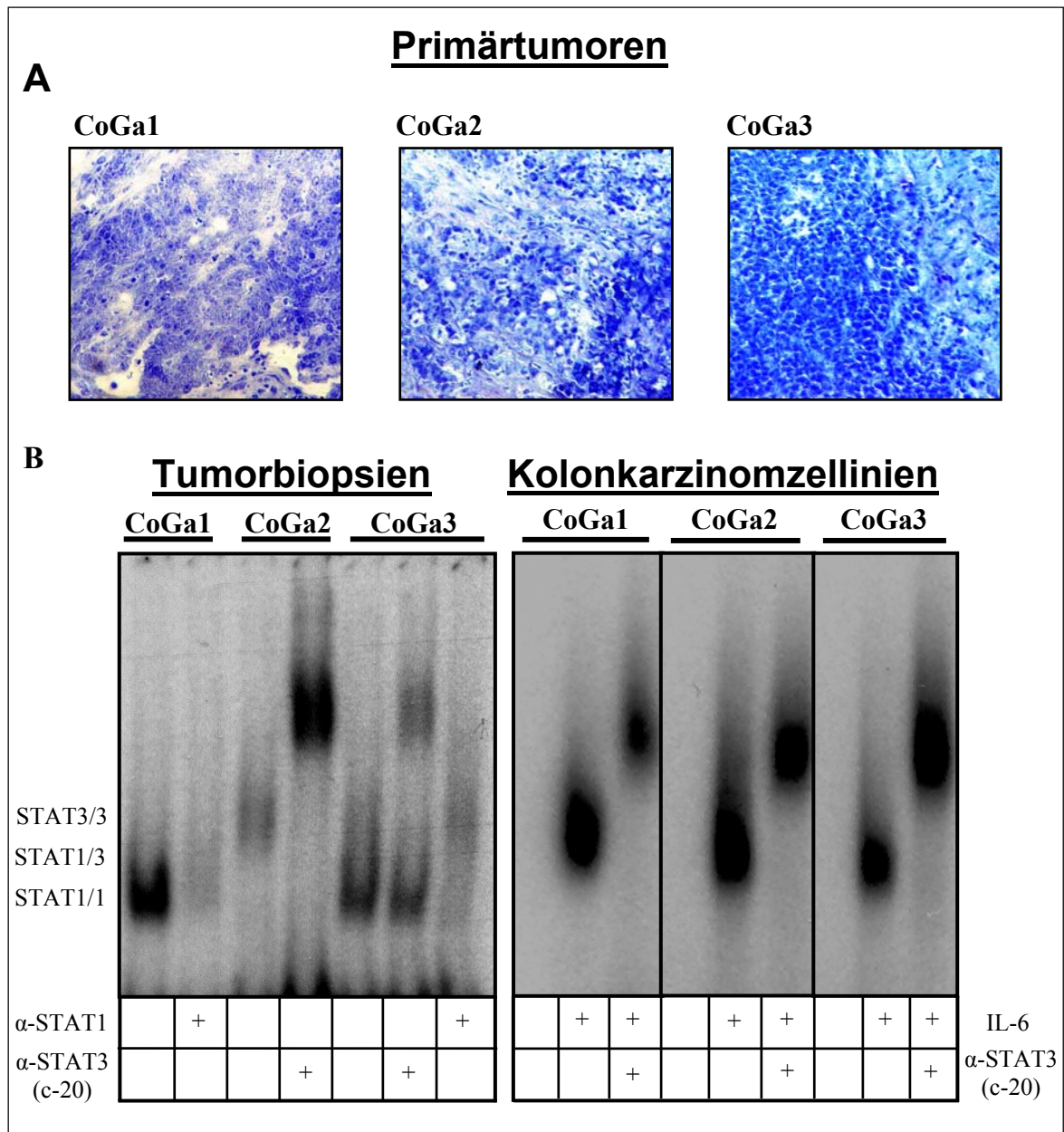


Abb.13 STAT-DNA-Bindungsanalysen der Zelllinien CoGa1, -2, und -3 und ihres ursprünglichen primären Tumorgewebes

A Die Gefrierschnitte des primären Tumorgewebes der CoGa-Zelllinien wurden mit Methylenblau gefärbt. Aus diesem Gewebe entwickelten Vécsey-Semjén et al. die Zelllinien CoGa1, -2 und -3. Die Aufnahmen erfolgten bei 400-facher Vergrößerung.

B Die Gewebeextrakte der in **A** gezeigten Tumoren (links) und der jeweiligen Zelllinien (rechts) wurden im EMSA hinsichtlich STAT3- und STAT1-Aktivität untersucht (Details siehe Abb.4 und 5). Die Zelllinien wurden für 30 min. mit IL-6 stimuliert. Die Expositionszeiten betrugen links 14 und rechts 19 h.

In *Abbildung 13* ist die vergleichende Analyse der Primärtumoren und der zugehörigen Zelllinien hinsichtlich ihrer STAT3-Aktivität dargestellt. Dabei zeigt **A** die Methylenblaufärbung von Gefrierschnitten der Primärtumoren, aus denen die Zelllinien

CoGa1, CoGa2 und CoGa3 entwickelt wurden. Eine genauere Beschreibung dieser Zelllinien findet sich in Tabelle 2 (Material und Methoden).

In **B** ist die STAT-DNA-Bindungsanalyse der in **A** gezeigten Tumoren zu sehen (links). Hierbei zeigt der zur Zelllinie CoGa1 gehörende Tumor ausschließlich STAT1-Bindung an das Oligonukleotid. Die Tumoren von CoGa2 und CoGa3 zeigen STAT3- bzw. STAT1- und STAT3-Aktivität.

Obwohl sich im primären Tumorgewebe dieser Zelllinien STAT-Aktivität nachweisen ließ, findet sich in den zugehörigen Zelllinien weder STAT3- noch STAT1-Aktivierung (rechts). Wie in den bereits früher untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29, SW-480 und CACO2 konnte auch in den CoGa-Zelllinien erst durch Stimulation mit IL-6 STAT3 aktiviert werden (Orth 2003). Da man auch in diesen Zelllinien keinerlei basale STAT3-Aktivität nachweisen konnte, bestätigt sich hier die Vermutung, daß die STAT3-Aktivierung kolorektaler Tumorzellen während der Kultivierung verloren geht (Corvinus et al. 2005).

Die hier gezeigten Befunde werfen Fragen über den Aktivierungsmechanismus von STAT3 im primären Tumorgewebe kolorektaler Karzinome auf. Dies wird in Kapitel 6.3 näher untersucht.

5.2 Expression und Aktivierung heterologer STAT3-Konstrukte in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms

Um die mögliche Rolle von STAT3 im Kontext pathophysiologischer Prozesse des kolorektalen Karzinoms zu untersuchen, wurden verschiedene Kolonkarzinomzelllinien mit funktionell unterschiedlichen STAT3-Konstrukten transduziert. Hierzu wurden die bereits erwähnten Zelllinien CoGa1, CoGa2 und CoGa3 verwendet, deren Ursprungsgewebe im vorangegangenen Kapitel hinsichtlich STAT-DNA-Bindung analysiert wurden. Außerdem wurden die kolorektalen Karzinomzelllinien CoGa12 und HT-29 eingesetzt. CoGa12 stammt ebenfalls aus der Arbeitsgruppe um Lukas Huber, das native Tumorgewebe dieser Zelllinie stand für Analysen jedoch nicht zur Verfügung (Vécsey-Semjén et al. 2002) (siehe Material und Methoden). HT-29 ist eine etablierte und häufig studierte Zelllinie und soll in dieser Arbeit als Referenzzelllinie dienen.

Alle Zelllinien wurden mit Hilfe eines retroviralen Expressions-Systems stabil transduziert. Zur Transduktion wurden drei verschiedene STAT3-Varianten verwendet: (1) STAT3 α wurde in den Zellen in seiner wildtypischen Form überexprimiert („w.t. STAT3“). (2) Das von Bromberg und Darnell entwickelte konstitutiv aktive STAT3 („c.a. STAT3“) liegt in Zellen als dauerhaft aktiviertes Dimer vor, da die Mutation von zwei Aminosäuren zu Cystein die Bildung von Disulfidbrücken zwischen STAT3-Proteinen ermöglicht. Es kann daher unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung dimerisieren und STAT3-Zielgene aktivieren (Bromberg et al. 1999). (3) Eine weitere Variante ist das dominant negative STAT3 („d.n. STAT3“), bei dem das C-terminale Tyrosin 705 zu Phenylalanin mutiert wurde, so daß es nicht durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. Diese STAT3-Mutation kann weder dimerisieren noch in den Zellkern translozieren, um an DNA zu binden. Da die SH-2-Domäne unverändert bleibt, schwächt diese Variante die Wirkung von STAT3 durch Konkurrenz um STAT3-bindende Determinanten von Rezeptoren und Kinasen.

Alle verwendeten Konstrukte wurden in der Arbeitsgruppe von E. Pfitzner erstellt und in den bizistronischen viralen Vektor pMX-IRES-GFP kloniert (siehe Material und Methoden). Dieser enthält zusätzlich ein Leseraster für das Fluoreszenzprotein GFP (Green Fluorescing Protein). Die Expression korreliert daher mit der grünen Fluoreszenz der Zellen. Als Kontrolle diente der „leere“ Vektor („GFP“). Die zur Transduktion verwendeten rekombinanten Retroviren entstammen der humanen retroviralen Verpackungszelllinie 293GPG (Daniel et al. 1996). Mit den jeweiligen Überständen dieser Zelllinie wurden die vier beschriebenen Konstrukte (w.t. STAT3, c.a. STAT3, d.n. STAT3 und GFP), wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, in die Kolonkarzinomzelllinien eingebracht.

5.2.1 Zytometrische Analyse verschiedener kolorektaler Tumorzelllinien nach Transduktion mit Expressionskonstrukten für STAT3

Aufgrund der Korrelation zwischen Expression und Intensität der GFP-Fluoreszenz läßt sich die Effizienz der Transduktion oben genannter Konstrukte zytometrisch ermitteln. Die Koexpression von GFP ermöglichte auch eine Aufkonzentrierung von exprimierenden Zellen durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Die Transduktionseffizienz und die Anzahl stark exprimierender Zellen wurde hierdurch jedoch nur unwesentlich erhöht (Daten nicht gezeigt).

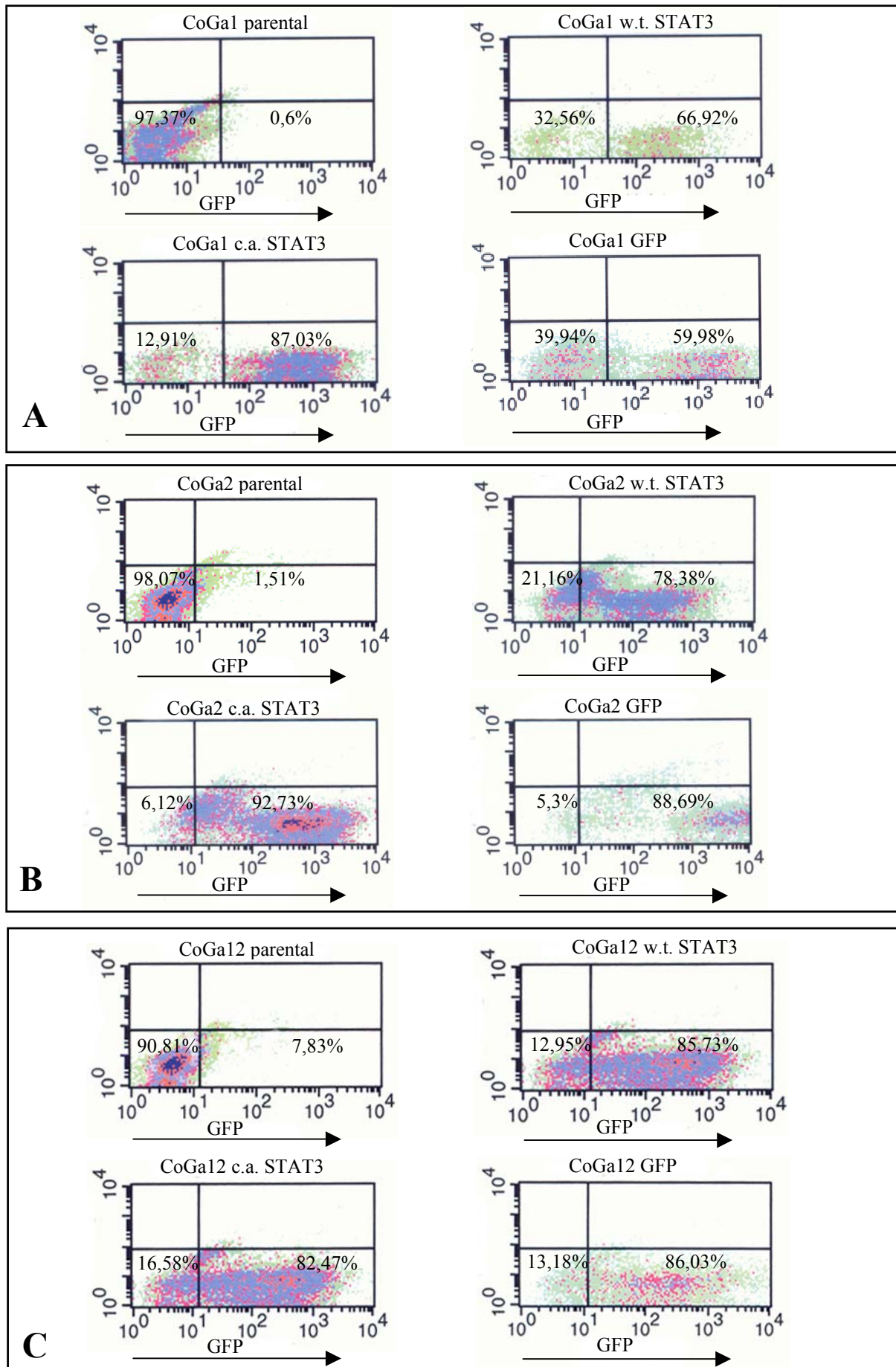
Abbildung 14 (Seite 58-59) zeigt die zytometrische Analyse der Zelllinien nach Transduktion mit unterschiedlichen STAT3-Varianten. In **A** werden die CoGa1-Zellen gezeigt. Hier findet sich die höchste Transduktionseffizienz in den c.a. STAT3 exprimierenden Zellen.

Die zytometrische Analyse von CoGa2 ist in **B** und von CoGa12 in **C** zu sehen. Hier liegen die Transduktionseffizienzen über 80%.

Die in Studien über das kolorektale Karzinom häufig verwendete Zelllinie HT-29 wurde in **D** analysiert. Abgesehen von der Expression des w.t. STAT3 mit einer Transduktionseffizienz von 96,8% ist diese mit ca. 60% für alle anderen Konstrukte in HT-29 vergleichsweise niedrig.

Ein weiteres Kriterium der zytometrischen Expressionsanalyse ist neben der Bestimmung der Transduktionseffizienz die Anzahl besonders stark exprimierender Zellen. Diese finden sich in den Abbildungen im äußeren rechten Bereich des unteren rechten Quadranten. So ist beispielsweise die Transduktionseffizienz von HT-29 w.t. STAT3 in **D** mit 96,8% sehr hoch, es finden sich jedoch fast keine Zellen mit einer höheren relativen GFP-Intensität als 10^3 .

Leider war es nicht möglich, die Zelllinie CoGa3 mit dem Virus zu transduzieren. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transduktion pyknotisch und starben ab. Da sich diese Reaktion bei allen Konstrukten, einschließlich der „leeren“ Vektorkontrolle CoGa3 GFP, ereignete, handelte es sich wahrscheinlich um keine STAT3-spezifische Reaktion, sondern vielmehr um eine Unverträglichkeit dieser Zellen gegenüber dem Virus und den Transduktionsbedingungen.



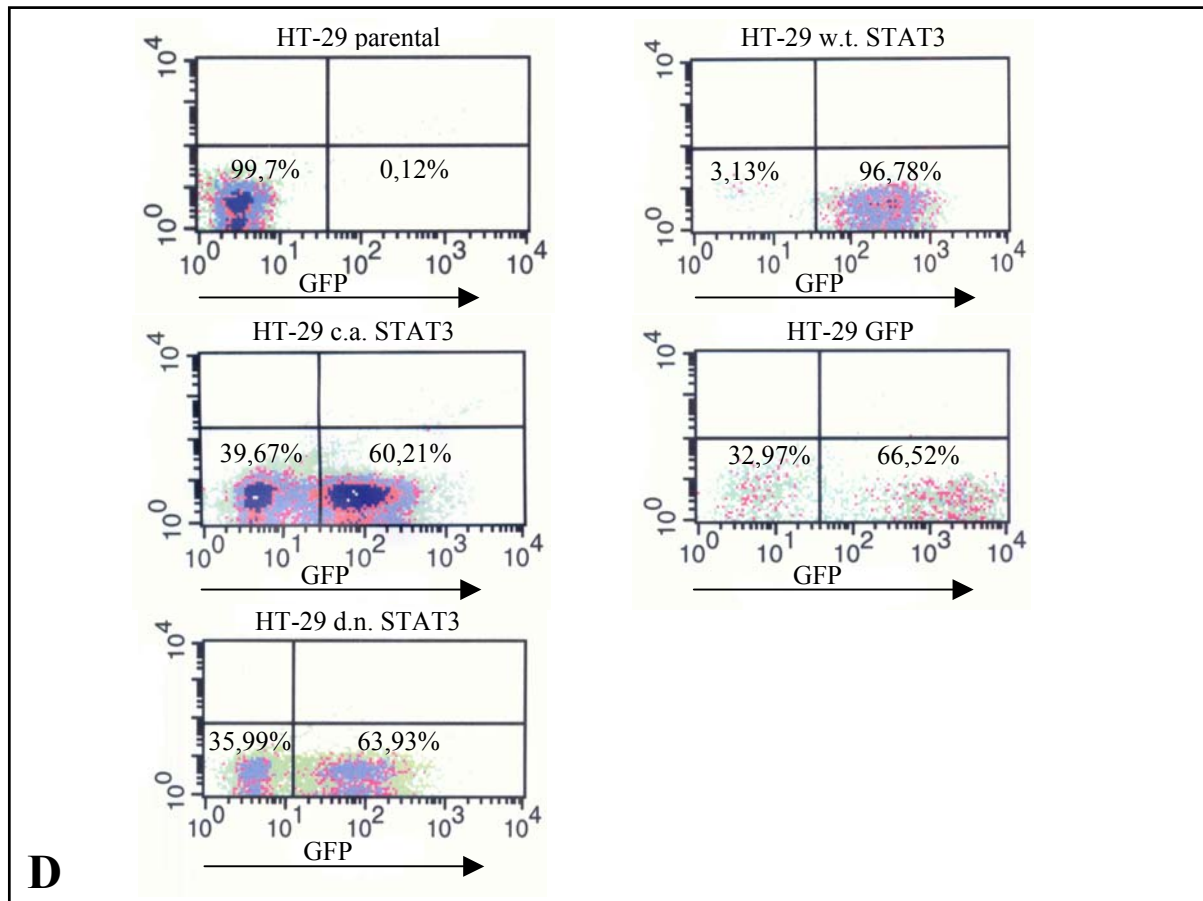


Abb.14 Expressionskontrolle nach Transduktion der Zelllinien CoGa1, CoGa2, CoGa12 und HT-29 mit unterschiedlichen STAT3-Varianten

Die Konstrukte w.t. STAT3, c.a. STAT3 und d.n. STAT3 wurden über den bizistronischen retroviralen Vektor pMX-IRES-GFP in die Zelllinien transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mit einer zytometrischen Analyse (Becton Dickinson) durch die ebenfalls auf dem Vektor kodierte GFP-Expression ermittelt. Die verwendeten Rahmen der gezeigten Dotblots wurden jeweils anhand der parental Zelllinie kalibriert. Die GFP-Expression nimmt von links nach rechts logarithmisch zu. Die farbliche Abstufung kodiert die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Diese nehmen von grün über rot bis hin zu dunkel-blau zu. Die y-Achse (FL-4 Height) ist für die Messung eines weiteren Fluoreszenzfarbstoffes definiert und daher in dieser Darstellung von untergeordneter Bedeutung. Es wurden zwischen 5.000 und 15.000 Ereignisse gemessen.

A CoGa1 **B** CoGa2 **C** CoGa12 **D** HT-29 (Anmerkung: Bei der zytometrischen Analyse von HT-29 d.n. STAT3 wurden die verwendeten Rahmen bei der Kalibrierung leicht verändert, da es sich hier um ein unabhängiges Experiment handelt. HT-29 wurde als einzige Zelllinie mit dem dominant negativen STAT3-Konstrukt transduziert).

Zusammengefaßt zeigt die zytometrische Expressionsanalyse die erfolgreiche Transduktion der kolorektalen Tumorzelllinien CoGa1, CoGa2, CoGa12 und HT-29 mit unterschiedlichen STAT3-Expressionskonstrukten. In der Mehrzahl der Fälle findet sich eine Transduktionseffizienz von weit über 60%. Den geringsten Anteil transduzierter Zellen hat CoGa1 GFP in **A**. Die höchste Effizienz zeigt sich in CoGa2 c.a. STAT3 (**B**) und HT-29 w.t. STAT3 (**D**) mit über 90%.

Die erfolgreiche Expression funktionell unterschiedlicher STAT3-Konstrukte in den genannten Kolonkarzinomzelllinien macht sie zu wichtigen analytischen Werkzeugen in den weiteren Untersuchungen zur Funktion von STAT3 im kolorektalen Karzinom.

5.2.2 Funktionelle Analyse heterologer STAT3-Konstrukte in kolorektalen Karzinomzelllinien

Nachdem die zytometrischen Analysen den Erfolg der Transduktionen belegt hatten, mußte die Funktion der einzelnen STAT3-Konstrukte anhand von biochemischen Methoden überprüft werden. Von besonderem Interesse war hierbei ihre DNA-Bindungsfähigkeit im EMSA und die Kontrolle ihrer Phosphorylierung und Expression im Western Blot. Da alle untersuchten Zelllinien keine eigene basale konstitutive STAT3-Aktivität besitzen (vgl. Abb.14), wurden zur Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung und der DNA-Bindung IL-6 Stimulationen durchgeführt. Alle verwendeten Zellen wurden hierzu 15 Stunden zuvor serumfrei kultiviert, um etwaige Effekte des Serums auf die STAT3-Aktivität auszuschließen, den basalen Phosphorylierungsgrad zu senken und somit die Signalintensität zu maximieren.

Abbildung 15 zeigt die Aktivierung von STAT3 in der etablierten Zelllinie HT-29 nach Transduktion der STAT3-Varianten w.t. STAT3, c.a. STAT3 und d.n. STAT3. In **A** ist die DNA-Bindungsaktivität mittels EMSA dargestellt. Da die c.a. STAT3-Variante spontan durch die Bildung von Disulfidbrücken dimerisiert, bildet sie unabhängig von einer IL-6-induzierten Phosphorylierung einen STAT3-DNA-Komplex. Im Vergleich zu den parentalen Kontrollen führte die Stimulation mit IL-6 bei HT-29 w.t. STAT3 zu einer erheblichen Zunahme und in d.n. STAT3 exprimierenden Zellen zu einer eindeutigen Verminderung der DNA-Bindungsaktivität an das Oligonukleotid.

Die Tyrosinphosphorylierung und Expression von STAT3 werden in **B** anhand eines Western Blots untersucht. Hier wird deutlich, daß, obwohl das konstitutiv aktive STAT3-Konstrukt auch ohne Phosphorylierung DNA bindet (siehe **A**), es nach Stimulation mit IL-6 tyrosinphosphoryliert wird. Die Untersuchungen mit dem α -Phospho-Tyrosin-705-STAT3-Antikörper decken sich in allen HT-29-Derivaten mit der DNA-Bindungsaktivität in **A**. Die Expressionskontrolle auf Proteinebene wurde mit dem N-terminalen H190-Antikörper durchgeführt. Die relativen Unterschiede der STAT3-Konzentrationen zwischen Zellen, die die heterologen STAT3-Konstrukte (HT-29 w.t. STAT3, HT-29 c.a. STAT3 und HT-29 d.n. STAT3) exprimieren, und den Kontrollen (parentale HT-29-Zellen und HT-29 GFP) bestätigen einen erhöhten STAT3-Gehalt.

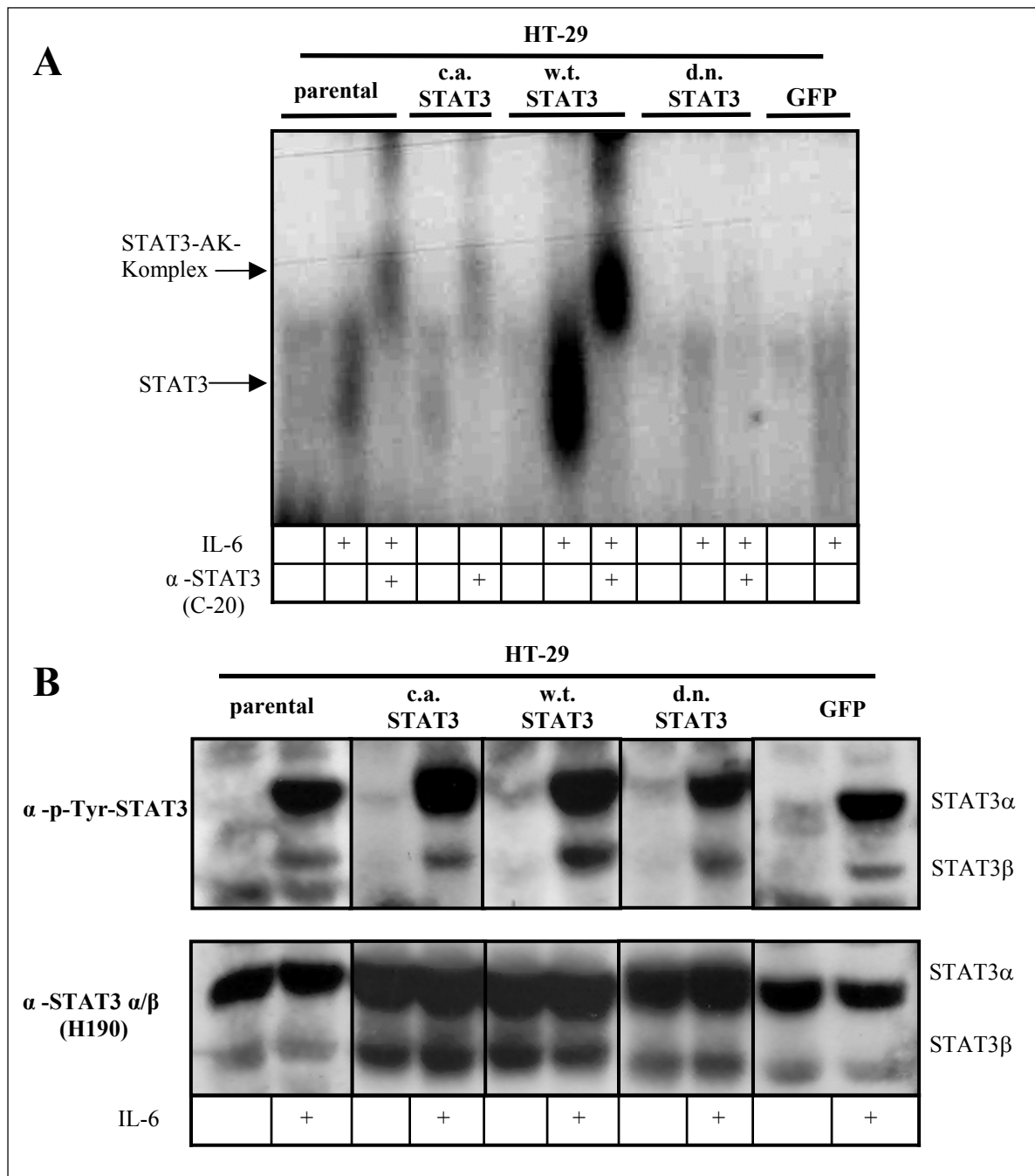


Abb.15 Untersuchung der STAT3-Aktivierung in HT-29 nach Transduktion funktionell unterschiedlicher STAT3-Konstrukte

Mit heterologen STAT3-Varianten transduzierte HT-29-Zellen wurden bei ca. 80%-iger Konfluenz für 15 h serumfrei kultiviert, bevor eine Stimulation mit 20 ng/ml IL-6 erfolgte. Die Zellen wurden zu Gewebeeextrakten verarbeitet und im EMSA bzw. Western Blot analysiert.

A Eine Proteimenge von je 20 µg wurde auf einem 6%-igen nicht-denaturierenden Acrylamid-Gel zusammen mit dem ³²P markierten SIEm67 Oligonukleotid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spezifität der STAT3-Banden wurde mit 1 µl des α-STAT3-Antikörper c-20 (Santa Cruz) nachgewiesen. Die Expositionszeit betrug 18 h.

B Je 50 µg Proteinextrakt wurden auf einem 7,5%-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotvorgang wurde die Gleichmäßigkeit der Proteinmengen durch Ponceaufärbung bestätigt. Die Membranen wurden für 72 h mit dem α-Phospho-Tyrosin-705-STAT3-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung inkubiert. Die Expositionszeit zur Detektion betrug 1 min. Der Phospho-STAT3-Antikörper wurde mit einer merkaptoethanolhaltigen Waschlösung von der Membran entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem α-STAT3-Antikörper H190 (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:1000 zur Expressionskontrolle für 24 h. Die Expositionszeit betrug hier 1,5 Minuten.

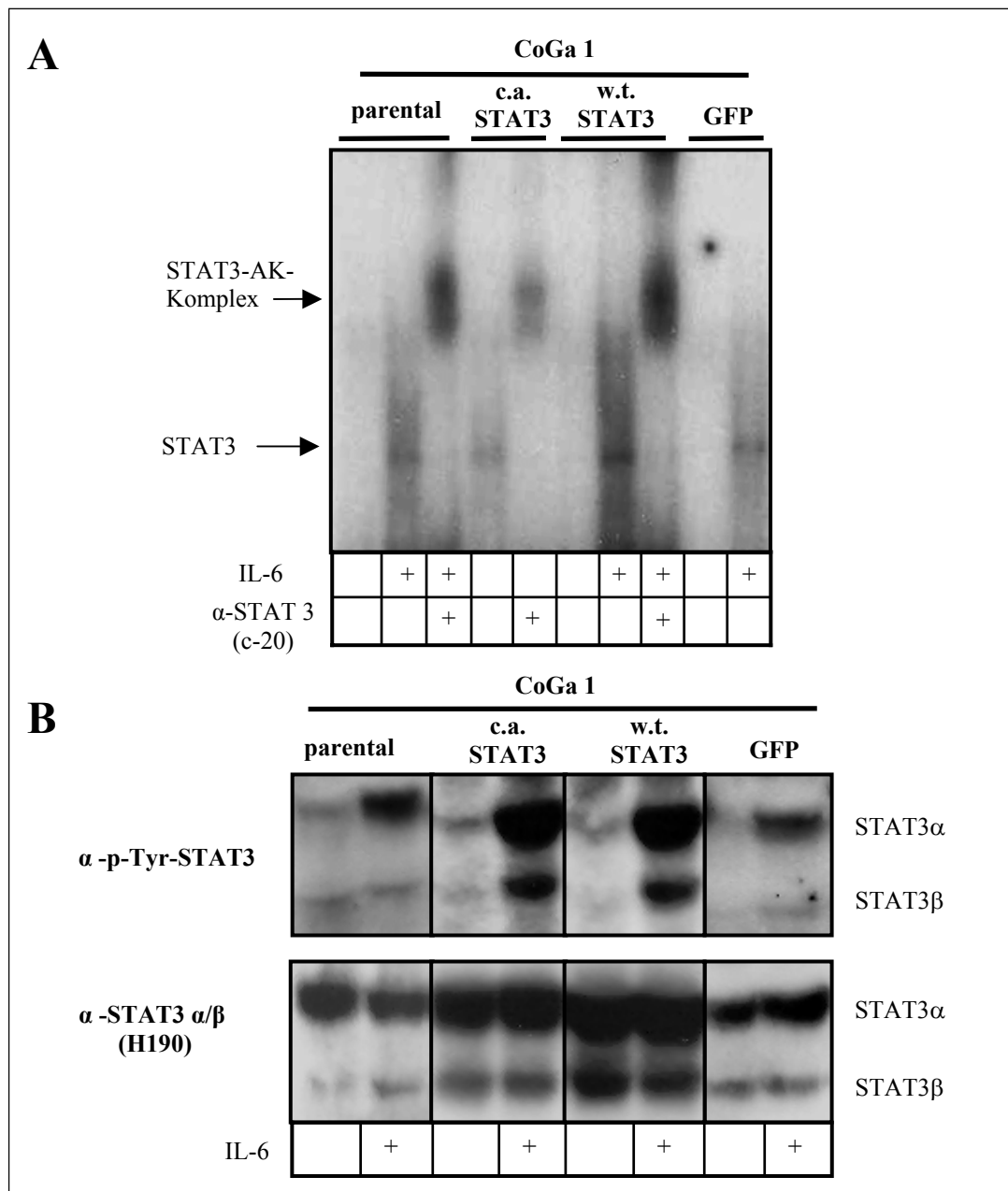


Abb.16 Analyse der STAT3-Aktivität und -Expression in CoGa1 nach Transduktion funktionell unterschiedlicher STAT3-Varianten

A EMSA und **B** Western Blot nach retroviraler Transduktion mit heterologen STAT3-Konstrukten. IL-6 Stimulationen wurden mit 20 ng/ml für 30 Minuten durchgeführt. Die Expositionsdauer für den EMSA betrug 13 h, für den Western Blot 2 bzw. 1,5 Minuten (Details siehe Abb. 15).

Abbildung 16 untersucht die STAT3-Aktivierung in unterschiedlichen STAT3-exprimierenden Derivaten der Zelllinie CoGa1. Hierzu wurde wie in *Abbildung 15* sowohl eine STAT3-DNA-Bindungsanalyse (**A**) als auch ein Western Blot zur Bestimmung der STAT3-Tyrosinphosphorylierung und -Expression auf Proteinebene (**B**) durchgeführt. Auch hier findet sich nach IL-6-Stimulation eine verstärkte STAT3-DNA-Bindung in STAT3-überexprimierenden Zellen und eine phosphorylierungsunabhängige konstitutive STAT3-Aktivität in CoGa2 c.a. STAT3.

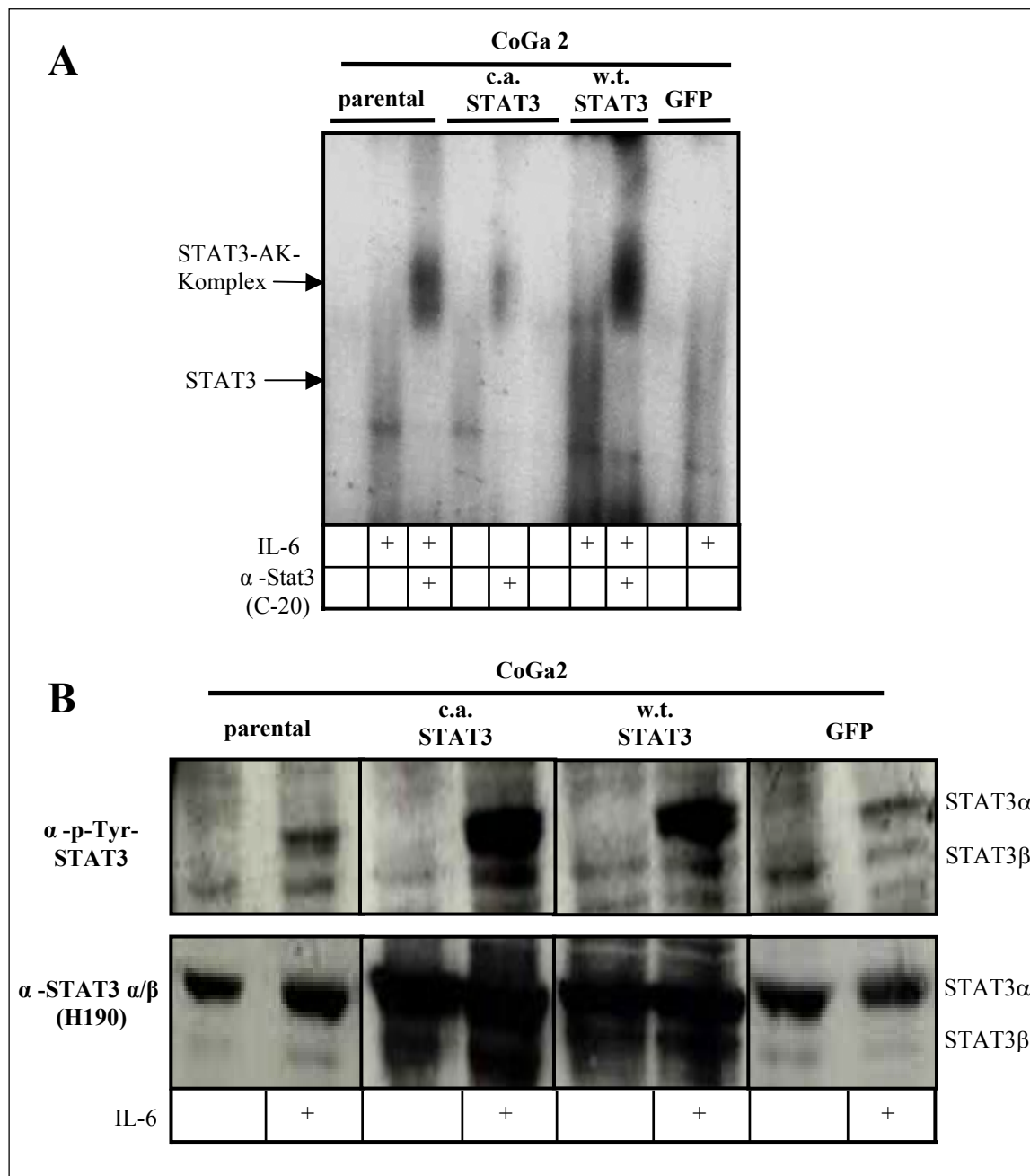


Abb.17 Analyse der Funktion und Expression von heterologen STAT3-Varianten in CoGa2

A STAT-DNA-Bindungsanalyse und **B** Western Blot der Zelllinie CoGa2 nach retroviraler Transduktion verschiedener STAT3-Konstrukte (genauere Angaben siehe Abb.15).

Die Expositionszeiten betrugen für **A** 13 h und für **B** jeweils 1 Minute zur Detektion.

In *Abbildung 17* wird ebenfalls durch einen EMSA und einen Western Blot die Funktion der transduzierten STAT3-Varianten w.t. STAT3 und c.a. STAT3 untersucht. Es finden sich ähnliche Ergebnisse wie in *Abbildung 15* und *Abbildung 16*.

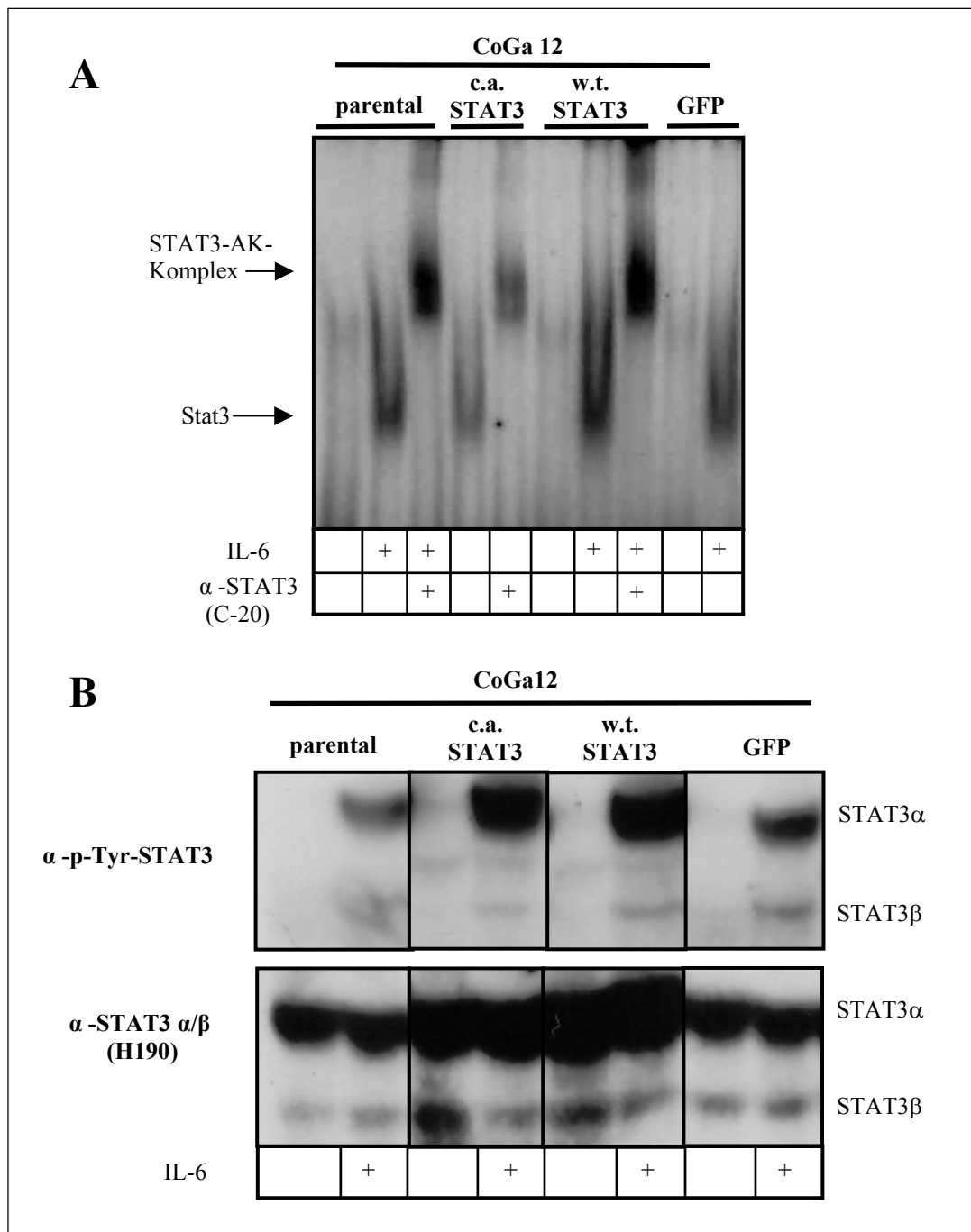


Abb.18 DNA-Bindung und Expression von STAT3 nach Transduktion von w.t. STAT3 und c.a. STAT3 in CoGa12

Funktionsanalyse nach Expression heterologer STAT3-Varianten in der Zelllinie CoGa12 durch EMSA (A) und Western Blot (B). Diese Experimente wurden in der gleichen Weise wie zuvor durchgeführt (Details siehe Abb.15)

Die Expositionszeiten betrugen für den EMSA 20 h und für den Western Blot 1 bzw. 1,5 Minuten.

Auch die Analysen zur DNA-Bindung, Tyrosinphosphorylierung und Expression von STAT3 in CoGa12 (Abbildung 18) zeigen wie in den vorherigen Abbildungen eine starke Zunahme der STAT3-Aktivität nach IL-6-Stimulation und eine erhöhte STAT3-Gesamtexpression im Vergleich zur parentalen Zelllinie bzw. CoGa12 GFP.

Faßt man die Ergebnisse der Abbildungen 15-18 zusammen, so lassen sie folgende Aussagen über die verschiedenen Derivate der kolorektalen Tumorzelllinien HT-29, CoGa1, CoGa2 und CoGa12 zu:

Die STAT3-DNA-Bindungsanalysen zeigen, daß das konstitutiv aktive STAT3-Konstrukt unabhängig von einer IL-6 induzierten Tyrosinphosphorylierung mit dem Bindungselement assoziiert und eine IL-6-Stimulation in STAT3 überexprimierenden Zellen (w.t. STAT3) zu einer deutlich stärkeren und die Expression von dominant negativem STAT3 zu einer schwächeren STAT3-Aktivierung führt.

Die Westernblotanalysen mit dem Phospho-STAT3-Antikörper zeigen ebenfalls zum einen diese Verstärkung bzw. Schwächung der STAT3-Aktivierung in Abhängigkeit von den jeweiligen Konstrukten und zum anderen, daß die konstitutiv aktive STAT3-Variante auch am Tyrosinrest 705 phosphoryliert wird. Dieser C-terminale Tyrosinrest wird durch die Mutation von STAT3 zu c.a. STAT3 nicht beeinträchtigt.

Die Expressionskontrollen mit dem N-terminalen Antikörper bestätigen eine Zunahme der relativen STAT3-Konzentrationen durch die Expression von heterologen STAT3-Varianten.

Die gezeigten Ergebnisse beweisen durch Kontrolle der STAT3-Expression, Tyrosinphosphorylierung und -DNA-Bindung die Funktionalität aller transduzierten STAT3-Konstrukte. Diese stabil transduzierten Derivate kolorektaler Tumorzelllinien ermöglichen vergleichende zellbiologische Untersuchungen zur Rolle von STAT3 im kolorektalen Karzinom.

5.3 Untersuchungen zur STAT3-Funktion in kolorektalen Karzinomzelllinien

Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wurden mehrere Zelllinien des kolorektalen Karzinoms mit unterschiedlichen STAT3-Varianten transduziert. Nachdem sowohl ihre Expression als auch Funktion nachgewiesen war, bildeten diese modifizierten Zelllinien die Grundlage für weiterführende Experimente zur Erforschung der Wirkungsweise von STAT3 im kolorektalen Karzinom.

5.3.1 Einfluß von STAT3 auf die Proliferation kolorektaler Karzinomzelllinien

Da STAT3 eine Vielzahl proliferationsfördernder Zielgene aktiviert (Bowman et al. 2000) und man seine proliferativen Eigenschaften in Zellen mehrerer Tumorerkrankungen, wie z.B. dem Mammakarzinom oder dem Prostatakarzinom, nachweisen konnte (Bromberg et al. 2002), wurden Proliferationsanalysen an kolorektalen Karzinomzelllinien durchgeführt. Hierbei wurde versucht, den Einfluß von STAT3 auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zelllinien zu definieren.

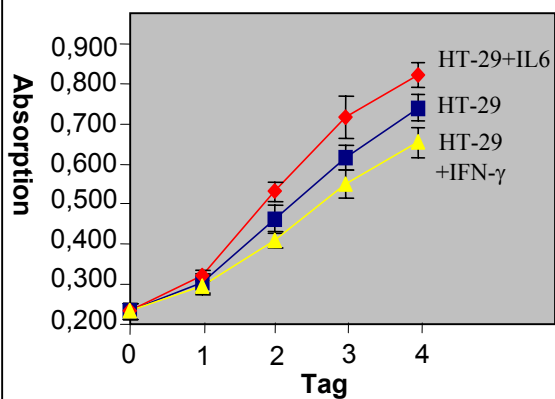
Da die vorangegangenen Versuche zur STAT-DNA-Bindung und Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in keiner der untersuchten Zelllinien eine basale STAT3-Aktivierung nachweisen konnten, wurde STAT3-Aktivität auf zweierlei Art induziert. (1) STAT3 konnte durch IL-6-Stimulation in allen Zelllinien aktiviert werden (siehe Abb. 15-18). Für das STAT3-aktivierende Zytokin IL-6 ist bereits eine proliferative Wirkung auf Tumorzellen beschrieben (z.B. Jelinek et al. 1997, Sriuranpong et al. 2003). Daher wurde es in den gezeigten Proliferationsanalysen als Induktor verwendet. (2) Ähnlich wie die Zytokine kann die Expression von STAT3-Varianten STAT3-Aktivierung beeinflussen. Daher wurden die beschriebenen Zelllinien, die unterschiedliche STAT3-Varianten stabil exprimieren (vgl. auch Abb. 15-18), vergleichsweise bezüglich ihres Proliferationsverhaltens untersucht.

Da sich auch in mehreren der untersuchten Primärtumoren eine STAT1-Aktivität nachweisen ließ, wurde der Effekt der STAT1-Aktivierung auf die Proliferation mit Hilfe von IFN- γ untersucht. Stimulationen mit IFN- γ führen zu einer STAT1-Aktivierung in Kolonkarzinomzelllinien (siehe Abb. 25). Eine wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzelllinien durch IFN- γ induzierte STAT1-Aktivierung ist bekannt (Levy et al. 2000).

Zur Untersuchung der Proliferation wurde das Meßverfahren CellTiter (Promega) verwendet. Hierbei wird ein Substrat in Mitochondrien durch Dehydrogenasen in eine photometrisch quantifizierbare Formazanverbindung umgewandelt, die mit der Zellzahl korreliert.

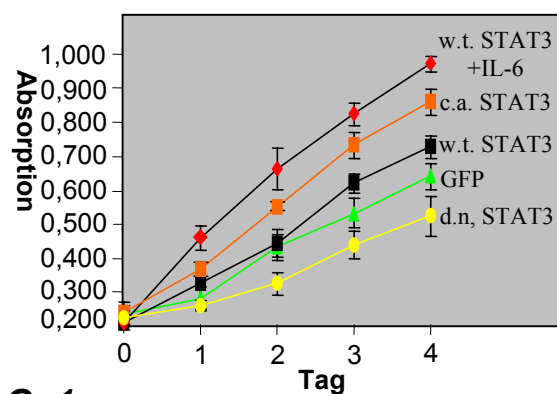
Proliferation

Zytokinstimulationen

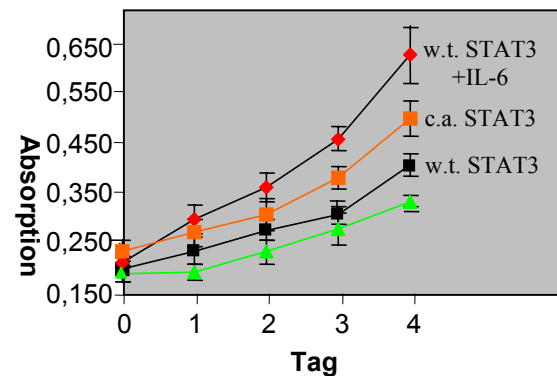
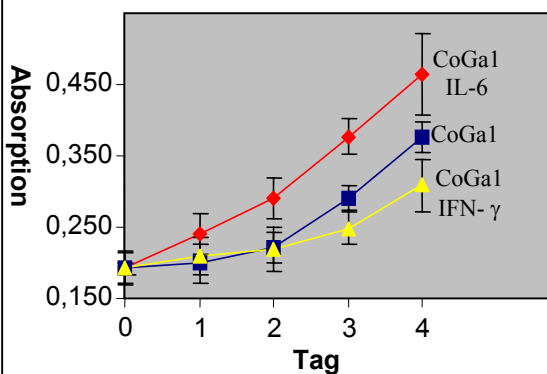


Expression von heterologen STAT3-Derivaten

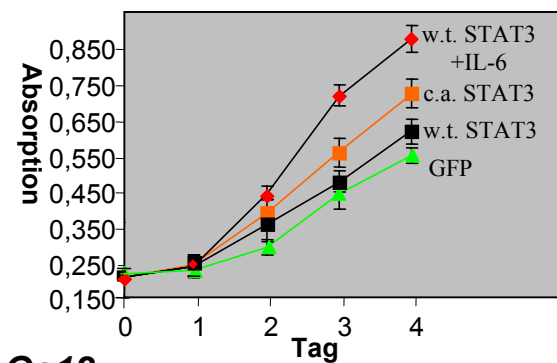
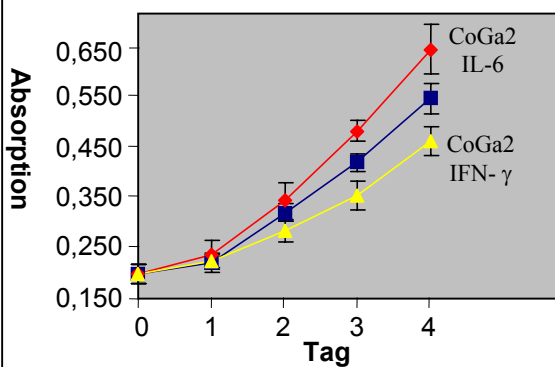
HT-29



CoGa1



CoGa2



CoGa12

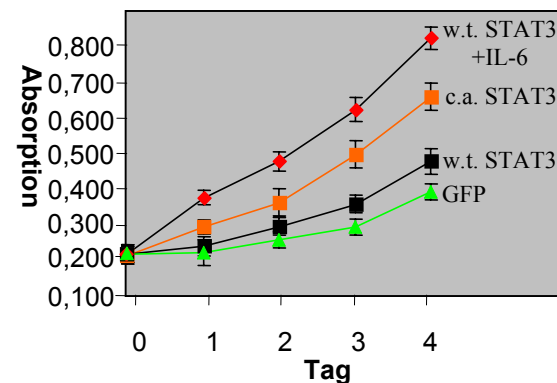
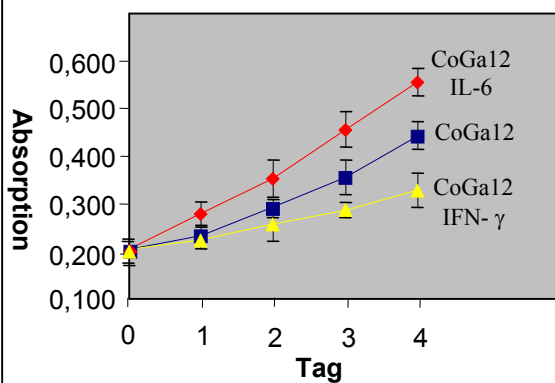


Abb.19 (vorherige Seite) Proliferationsverhalten kolorektaler Karzinomzelllinien in Abhängigkeit von STAT3-Aktivierung

Die Effekte von STAT1 und STAT3 auf das Wachstumsverhalten der verwendeten Kolonkarzinomzelllinien und ihre Derivate wurden in einem MTS-basierten Proliferationsstest analysiert (Details siehe Material und Methoden). Es wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen je 4 Messungen pro Meßpunkt durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Links: Die Wirkung des STAT3-aktivierenden IL-6 und des STAT1-aktivierenden IFN- γ auf das Proliferationsverhalten der untransduzierten Zelllinien.

Rechts: Die Auswirkungen der unterschiedlichen heterolog exprimierten STAT3-Varianten auf das Zellwachstum.

Die Messung zum Zeitpunkt 0 erfolgte 5 h nach der Aussaat der Zellen. Die Stimulationen mit IL-6 bzw. IFN- γ wurden mit einer Konzentration von jeweils 20 ng/ml durchgeführt (s. auch Abb.25).

Abbildung 19 (Seite 65) zeigt die Proliferationskinetiken der untransduzierten Zelllinien nach Zytokinstimulation (links) und transduzierten Zelllinien (rechts). Auf der linken Seite ist die Wirkung der Zytokine IL-6 und IFN- γ auf die parentalen Zelllinien dargestellt. Es zeigt sich, daß HT-29 nach IL-6 Stimulation mit einer Zunahme der Proliferation reagiert. Unter IFN- γ ist ein tendenzieller Rückgang der Proliferationsgeschwindigkeit zu beobachten.

Besonders deutlich wird ein proliferative Effekt von STAT3 in den transduzierten Zelllinien (rechte Seite). Die Transduktion des konstitutiv aktiven STAT3-Konstruktes (c.a. STAT3) führt in HT-29 zur deutlichen Zunahme des Zellwachstums. Die STAT3 überexprimierenden Zellen (w.t. STAT3) wurden hier zusätzlich durch IL-6-Stimulation aktiviert. Daraus resultiert die stärkste Zunahme der Proliferation. Die Überexpression von STAT3 in HT-29 führt im Vergleich zu HT-29 GFP auch ohne Stimulation zu etwas schnellerem Wachstum; welches durch IL-6-Stimulation noch verstärkt werden konnte. Die dominant negative STAT3-Variante (HT-29 d.n. STAT3) wirkt hemmend auf die Proliferationsgeschwindigkeit. Die Auswirkung der STAT1- und STAT3-Aktivierung auf das Wachstum von HT-29 wurde an dieser Stelle exemplarisch beschrieben und ist in den weiteren Zelllinien sehr ähnlich. Aus diesem Grund werden die weiteren Wachstumskurven nicht im Detail besprochen.

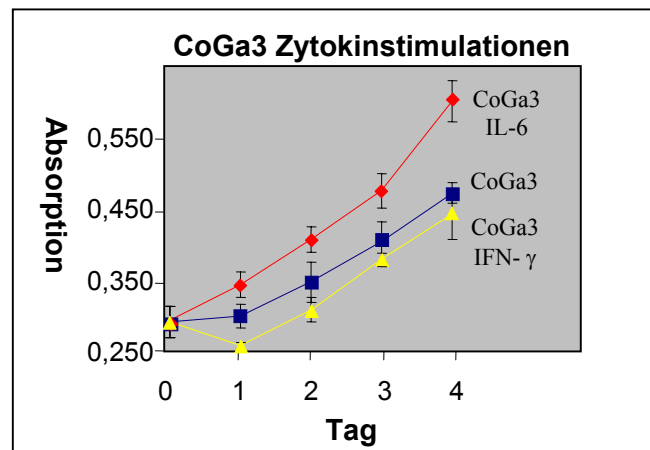


Abb.20 Wachstumsverhalten der Zelllinie CoGa3 in Abhängigkeit von IL-6 und IFN- γ

Die Auswirkung von STAT1 und STAT3 auf die Proliferation der CoGa-Zelllinien wurde bereits in Abbildung 19 untersucht. Hier wurde die Wirkung der Stimulationen mit den Zytokinen IFN- γ und IL-6 auf CoGa3 nachgetragen (Details s. Abb.19). CoGa3 ließ sich zuvor nicht mit einem amphotropen Virus transduzieren. Eine Gegenüberstellung mit transduzierten Derivaten war daher hier nicht möglich.

Abbildung 20 zeigt ergänzend die Wirkung der oben genannten Zytokine auf die Proliferation von CoGa3. CoGa3-Zellen konnten nicht wie die zuvor gezeigten Zelllinien mit STAT3-Varianten transduziert werden (siehe Kapitel 6.1). Interessanterweise zeigte der Primärtumor dieser Zelllinie in den vorangegangenen Untersuchungen sowohl STAT1- als auch STAT3-Aktivität, die während der Zellkultivierung verloren ging (s. Abb.9).

Auch hier findet sich eine deutliche Zunahme der Proliferation unter IL-6-Stimulation. Der Effekt des IFN- γ hebt sich von den zuvor gezeigten Kurven ab. Die Zellen reagieren einen Tag nach Stimulation mit einem deutlichen Rückgang der Proliferation, gleichen diesen aber in den folgenden Tagen wieder aus. Ein Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten nach IFN- γ Stimulation und der Koaktivität von STAT1 und STAT3 im nativen Gewebe ist aufgrund dieses Ergebnisses denkbar, müßte jedoch anhand weiterführender Experimente geklärt werden (vgl. Diskussion).

Zusammengefaßt lassen Abbildung 16 und 17 die folgenden Aussagen zu: IL-6 aktiviert in allen Zelllinien durch Phosphorylierung STAT3 (vgl. auch Abb.15-18) und führt gleichzeitig zu schnellerem Wachstum. Dieses geht nach Aktivierung von STAT1 durch Stimulation mit IFN- γ mehr oder weniger deutlich zurück (vgl. auch Abb.25). Sowohl die Expression des

konstitutiv aktiven STAT3-Konstruktes als auch die IL-6 Stimulation von STAT3 überexprimierenden Zellen führt zu einer deutlichen Zunahme der Proliferationsgeschwindigkeit. Die Expression des STAT3-Wildtyps und der dominant negativen STAT3-Variante beeinflusst auch unabhängig von einer Stimulation die Proliferationsrate der transduzierten Zelllinien (vgl. Diskussion).

5.3.2 Tumorwachstum nach xenogener Transplantation der Zelllinie HT-29 in Nacktmäuse

Ergebnisse aus der Zellkultur von Tumorzellen sind nur bedingt mit physiologischen Verhältnissen vergleichbar. Um das Verhalten der Zelllinien im Organismus zu untersuchen, wurden daher sowohl HT-29-Zellen als auch deren Derivate, die verschiedene STAT3-Varianten exprimieren, immundefizienten Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäusen in das subkutane

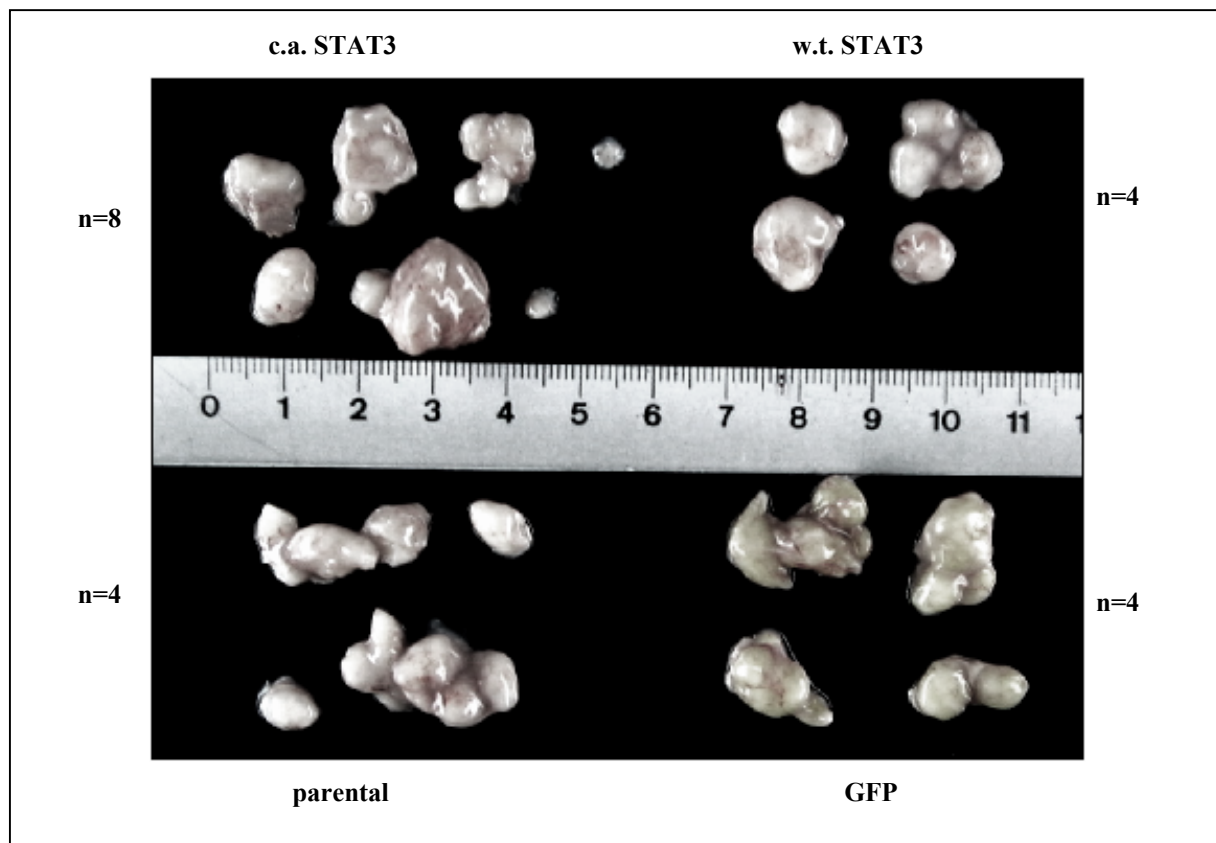


Abb.21 Tumorwachstum nach subkutaner Injektion der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 in Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäuse

10^5 Zellen der unterschiedlich transduzierten Zelllinie HT-29 wurden subkutan in den Nacken von fünf bis acht Wochen alten athymischen männlichen Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäusen injiziert. 8 Mäusen wurden die mit dem konstitutiv aktiven STAT3-Konstrukt transduzierten HT-29-Zellen injiziert. HT-29 w.t. STAT3-Zellen und die Kontrolle HT-29 GFP, sowie die untransduzierten parental Zellen wurden jeweils Gruppen von 4 Mäusen appliziert. Die Mäuse wurden, nach dem eine Tumorgroße von etwa 2000 mm^2 erreicht war, getötet. Die Tumoren wurden entnommen und biochemisch bzw. histologisch analysiert (vgl Abb. 21-23).

Bindegewebe injiziert. Die Mäuse entwickelten nach ca. einem Monat Tumoren und wurden nach zwei Monaten bei einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 2000 mm² getötet.

In *Abbildung 21 (Seite 68)* werden die entstandenen Tumoren nach Entnahme gezeigt. Die untransduzierten parentalen HT-29-Zellen, sowie ihre transduzierten Varianten HT-29 w.t. STAT3 und HT-29 GFP wurden jeweils Gruppen von 4 Mäusen appliziert. HT-29 c.a. STAT3-Zellen wurden insgesamt 8 Mäusen in den Nacken injiziert.

Mit Ausnahme von 2 der mit HT-29 c.a. STAT3 injizierten Gruppe entwickelten alle Mäuse Tumoren. Die Tumorgrößen variierten stark innerhalb der Gruppen und ließen sich daher nicht mit der jeweiligen transduzierten STAT3-Variante korrelieren.

5.3.3 DNA-Bindung, Phosphorylierung und Expression von STAT3 in xenogenen Tumoren von HT-29-Zellen

Während den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte in der Mehrzahl der untersuchten kolorektalen Tumorproben eine deutliche STAT3-Aktivität nachgewiesen werden. Es waren daraufhin insgesamt 7 unterschiedliche Kolonkarzinomzelllinien, CoGa1, -2, -3 und -12, HT-29, CACO2 und SW480, hinsichtlich STAT3-Aktivität untersucht worden. Keine dieser Zelllinien zeigte eine konstitutive STAT3-Aktivität (Orth 2002, Corvinus et al. 2005). Obwohl in dem Ursprungsgewebe der Zelllinien CoGa2 und CoGa3 STAT3 aktiviert ist, läßt sich diese Aktivität nach Kultivierung dieser Tumorzellen nicht nachweisen (vgl. Abb.13). Daraus war der Schluß gezogen worden, daß die untersuchten Kolonkarzinomzelllinien unter den Umständen der Zellkultivierung ihre STAT3-Aktivität verlieren.

Dies warf die Frage nach der Aktivität von STAT3 in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 während der Tumorbildung nach xenogener Transplantation im Mausmodell auf (siehe oben).

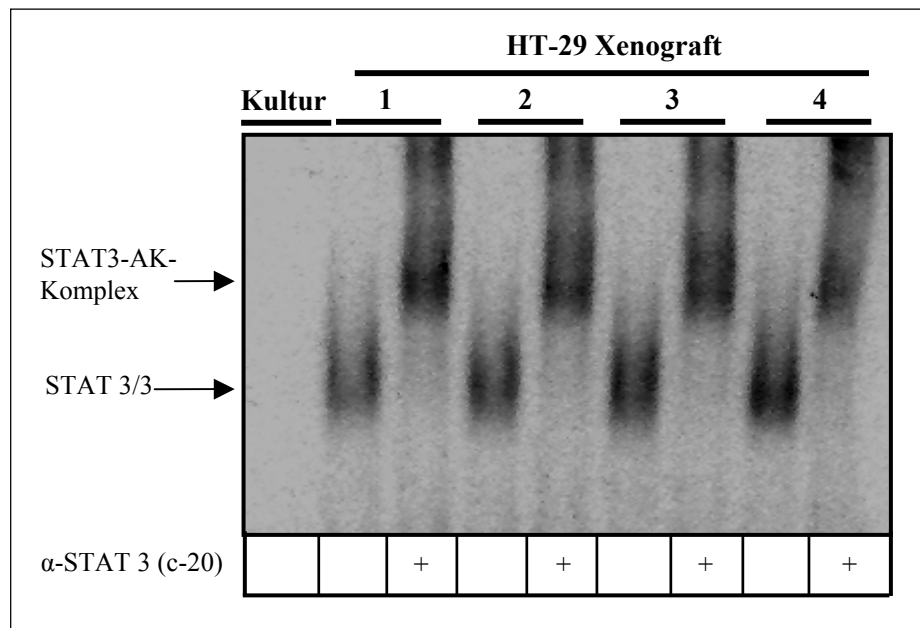


Abb.22 STAT3-Aktivität der Xenograft Tumoren in Nacktmäusen nach subkutaner Injektion von HT-29-Zellen

Analyse zur STAT3-DNA-Bindungsaktivität von HT-29-Tumoren in Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäusen mittels EMSA und Antikörper-„Supershift“ wie in Abb.15. Es werden die vier Tumoren der parentalen Zelllinie gezeigt. Als Negativkontrolle ist links ein Lysat der unter Zellkulturbedingungen kultivierten parental HT-29-Zelllinie aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 14 h.

Daher wurde zunächst eine Analyse der DNA-Bindung von STAT3 in den xenogenen Tumoren aus untransduzierten (parentalen) HT-29 Zellen durchgeführt (*Abbildung 22*). Erstaunlicherweise konnte in allen vier untersuchten Tumoren STAT3-Aktivität durch Bindung an das ^{32}P -markierte SIEm67 Oligonukleotid nachgewiesen werden. In der ursprünglichen Zelllinie, aus der diese Tumoren hervorgingen (erste Spur), war hingegen keine STAT3-Aktivierung nachweisbar. Die Spezifität des STAT3-DNA-Bindungskomplexes wurde auch hier mit dem Antikörper c-20 (Santa Cruz) nachgewiesen.

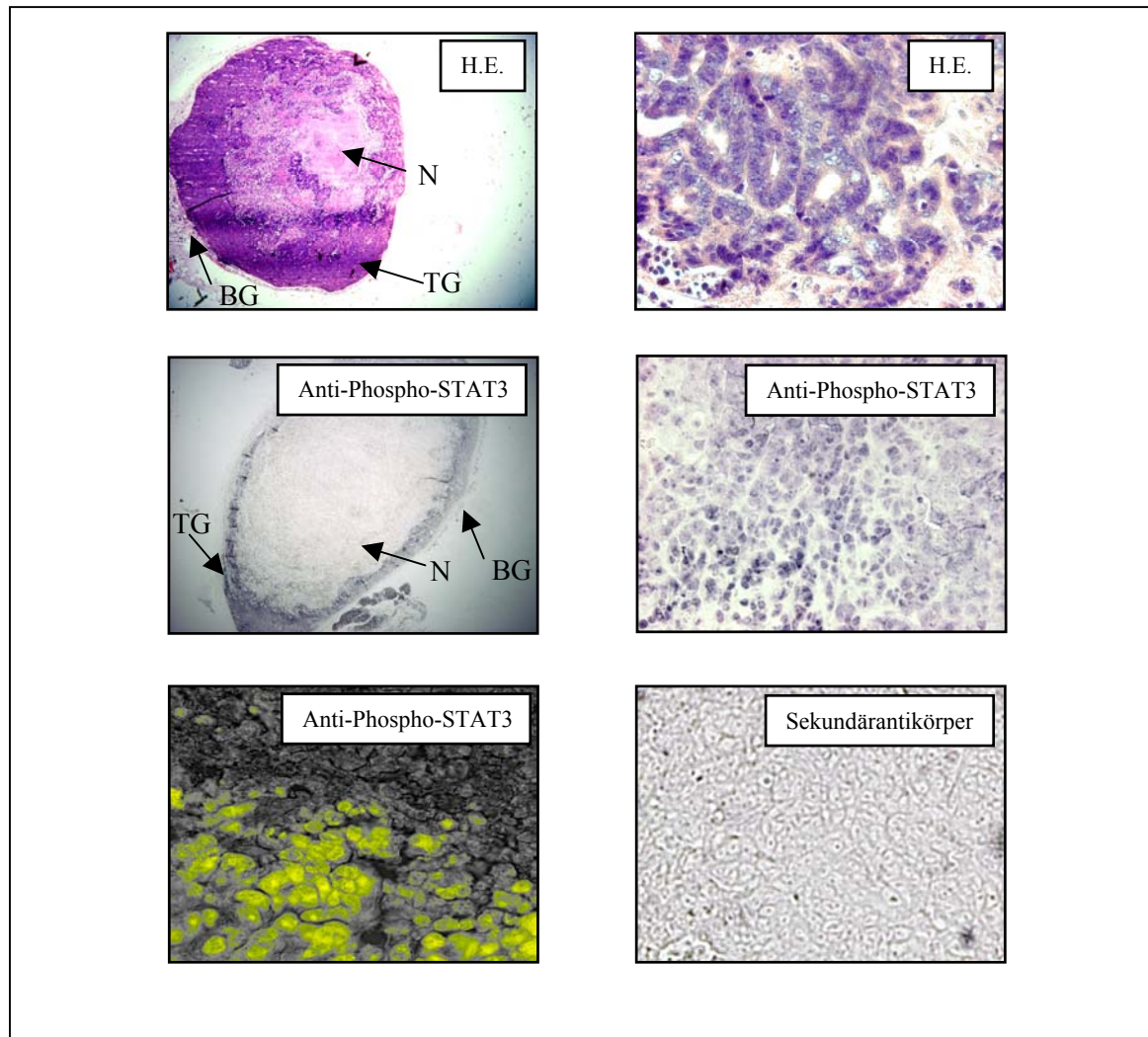


Abb.23 Immunhistochemische Untersuchung eines Xenograft-Tumors nach Transplantation der Zelllinie HT-29 in Nacktmäuse

Nach Tumorbildung von HT-29-Zellen in Nacktmäusen wurde ein Teil des entnommenen Gewebes formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurde eine H.E. Färbung (oben) und die immunhistologische Darstellung mit dem spezifischen Antikörper gegen das an Tyrosin-705-phosphorylierte STAT3 (New England Biolabs) (Mitte) durchgeführt. Die Übersichtsaufnahmen sind ca. 40-fache und die Detailaufnahmen ca. 400-fache vergrößert. Links unten ist ein Ausschnitt des Tumors laserinversionsmikroskopisch dargestellt. Rechts unten wird die Spezifitätskontrolle des STAT3-Signals durch alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper gezeigt. Die Detektionszeit für Phospho-STAT3 betrug 10 Minuten.

BG Bindegewebe **TG** Tumorgewebe **N** Nekrose

Um den exakten Ursprung der STAT3-Aktivität innerhalb des xenogenen Tumorgewebes zu lokalisieren, wurden immunhistologische Analysen mit dem im Western Blot der Abbildung 24A verwendeten Phospho-Tyrosin-705-STAT3-Antikörper durchgeführt.

Die Morphologie des tumorösen Wachstums kolorektaler Karzinomzelllinien im xenogenen Milieu wird in *Abbildung 23* mit einer H.E. Färbung erfaßt. Die schwache Vergrößerung zeigt einen Querschnitt durch den gesamten Tumor. Es lassen sich drei verschiedene Zonen voneinander abgrenzen. Der Rand zum angrenzenden Gewebe ist kapselartig mit

Bindegewebe organisiert (BG). In Randnähe befindet sich das Tumorgewebe (TG) epithelialen Ursprungs als breiter dunkelvioletter basophiler Saum. Im Zentrum des Tumors liegt ein Nekroseherd (N) mit charakteristischer rosaroter eosinophiler Anfärbung. Die Vergrößerung verdeutlicht die Anordnung der Tumorzellen im Gewebeverband. Bei genauerer Betrachtung fallen teilweise kryptenartige Zellformationen, ähnlich den typischen Tumorkrypten der Primärtumoren (s. z.B. Abb. 7), auf.

Die immunhistochemische Färbung korreliert in auffälliger Weise mit der Dreischichtigkeit dieser Tumoren. Die Übersicht verdeutlicht, daß sich weder in der Nekrose noch im Bindegewebe ein spezifisches Phospho-STAT3-Signal nachweisen läßt. Die stärkere Vergrößerung, vor allem aber die lasermikroskopische Darstellung zeigt besonders eindeutig die Kernlokalisierung von STAT3 in den Tumorzellen. Die Negativkontrolle bestätigt die Spezifität des Signals. Die Kerne erscheinen leer, vereinzelt sind Nukleolen zu sehen.

Nachdem zuvor in den xenogenen Tumoren der Zelllinie HT-29 eine deutliche STAT3-Aktivierung nachgewiesen worden war und die unterschiedliche Expression von STAT3 in den verwendeten Zell-Derivaten keinen eindeutigen Einfluß auf die Größe der einzelnen Tumoren hatte, lag die Vermutung nahe, daß es während der Tumorbildung in HT-29 zu einem Expressionsverlust der transduzierten STAT3-Varianten gekommen war. Um dies zu überprüfen wurde eine Expressionskontrolle von STAT3 mittels Western Blot durchgeführt.

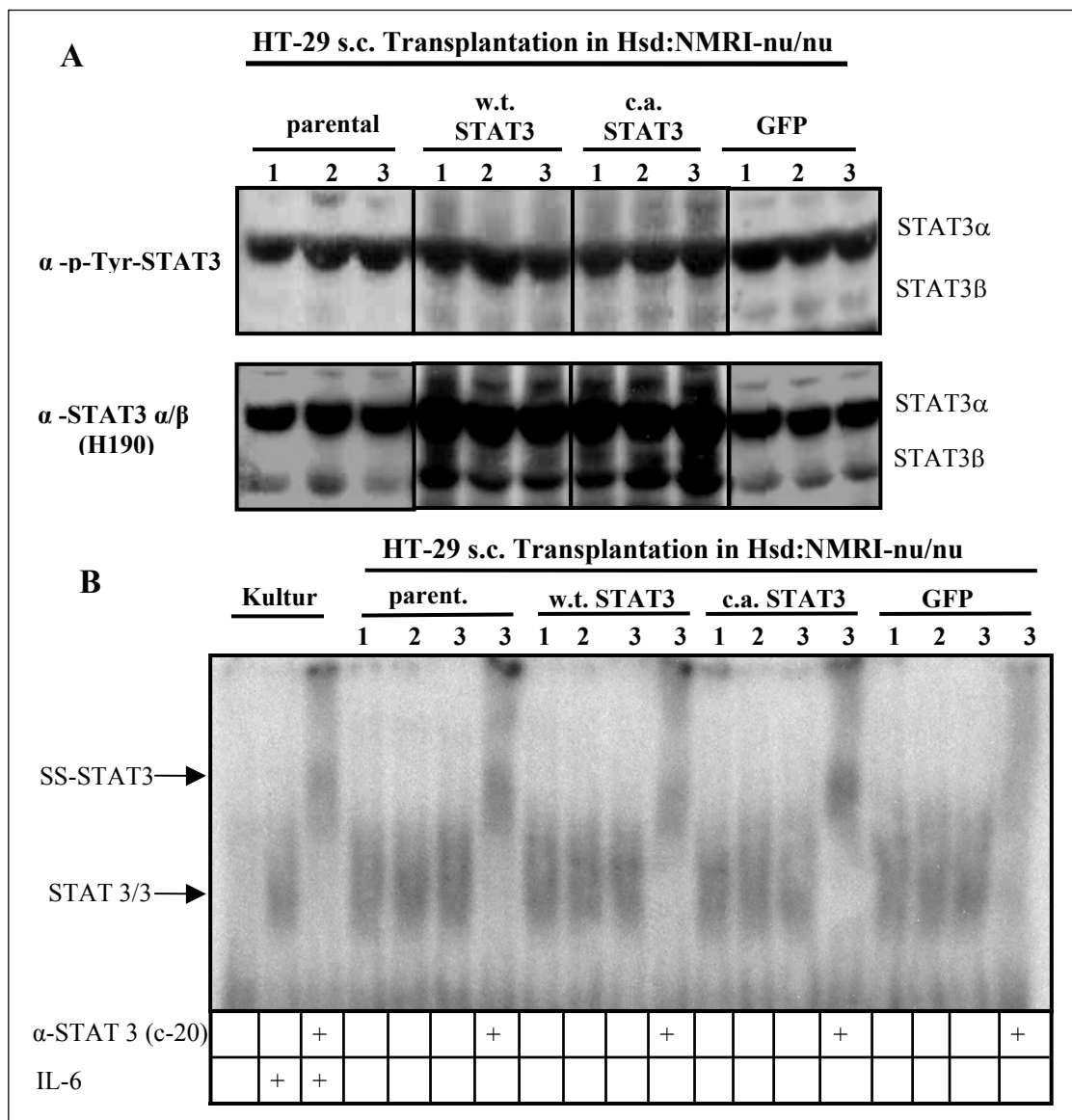


Abb.24 STAT3-Aktivität von HT-29 nach subkutaner Injektion in Hsd:NMRI-nu/nu Nacktmäuse

A Eine Auswahl der oben gezeigten Xenografttumoren wurde im Western Blot hinsichtlich STAT3-Phosphorylierung und Expression untersucht. Die Expositionszeit betrug für anti-p-Tyr-STAT3 3 Minuten und für die Expressionskontrolle 1 Minute (Details s. Abb.15B).

B Jeweils 3 Gewebeextrakte der unterschiedlich transfizierten HT-29-Tumoren wurden durch EMSA hinsichtlich ihrer STAT3-Bindungsaktivität untersucht. Der STAT3-Komplex wurde exemplarisch für jede Gruppe einmal mit dem STAT3-Antikörper c-20 (Santa Cruz) identifiziert. Als Kontrolle wurde links ein Lysat der parentale HT-29-Zelllinie unter Kulturbedingungen aufgetragen. Die Expositionszeit betrug 12 h (Details s. Abb. 15A).

In *Abbildung 24* werden die xenogenen Tumoren nach Transplantation der unterschiedlich transduzierten HT-29-Derivate (HT-29 w.t. STAT3, HT-29 c.a. STAT3 und HT-29 GFP) im Western Blot und EMSA dargestellt. **A** zeigt die STAT3-Phosphorylierung und Expression im Western Blot. Wie bei den zuvor untersuchten parentalen Zellen findet sich in allen untersuchten Gruppen eine STAT3-Aktivierung. Besonders auffällig ist die sehr gleichmäßige STAT3-Phosphorylierung, da Unterschiede der STAT3-Aktivität zwischen den einzelnen

Gruppen ähnlich wie nach IL-6-Stimulation (vgl. Abb.15) zu erwarten gewesen wären. Die Expressionskontrolle wurde mit dem N-terminalen H190-Antikörper durchgeführt. Dieser kann die erhöhten STAT3-Konzentrationen der transduzierten Gruppen HT-29 w.t. STAT3 und HT-29 c.a. STAT3 im Vergleich zu den Kontrollen klar nachweisen. Daher konnte gezeigt werden, daß die Überexpression der verwendeten STAT3-Konstrukte erhalten blieb, so daß ein Expressionsverlust ausgeschlossen werden konnte.

Die Analyse zur DNA-Bundungsaktivität in **A** bestätigt dieses Resultat. Auch hier finden sich zwischen den einzelnen Gruppen ähnlich der STAT3-Phosphorylierung in **B** keine signifikanten Unterschiede. Die ersten drei Spuren zeigen die parentale Zelllinie HT-29 unter Zellkulturbedingungen mit und ohne IL-6-Stimulation. Exemplarisch wurde in jeder Gruppe bei jeweils einem Tumor die STAT3-Bande mit einem Antikörper verifiziert.

Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zu drei Aussagen: (1) Sowohl die Transduktion von konstitutiv aktivem STAT3, als auch die Überexpression von STAT3 in seiner wildtypischen Form in kolorektalen Karzinomzellen führte zu keinem signifikanten Einfluß auf das *in vivo* Tumorwachstum in Nacktmäusen. 2. Obwohl STAT3 unter Zellkulturbedingungen in kolorektalen Karzinomzellen nicht aktiviert ist, führt ihre subkutane Transplantation im Mausmodell zur STAT3-Aktivierung. 3. Trotz der Überexpression des wildtypischen STAT3 und der konstitutiv aktiven Variante in den tumorbildenden Zellen zeigen alle xenogenen Tumorproben eine ähnlich starke STAT3-Aktivität.

Dies könnte erklären, warum es in den Gruppen STAT3-transduzierter Tumorzellen zu keinem signifikanten Unterschied der Tumorgroße kam. Da eine stabile Expression der verwendeten Konstrukte bestätigt werden konnte, ist hierbei denkbar, daß die transplantierten Zellen STAT3-Aktivität durch begrenzende Mechanismen auf ein bestimmtes Niveau senken. Weiterführende Experimente aus diesem Labor konnten diese Hypothese unterstützen. So konnte gezeigt werden, daß die Transduktion von HT-29-Zellen mit dem dominant negativen STAT3-Konstrukt im Vergleich zur untransduzierten Gruppe im Mausmodell zu signifikant kleineren Tumoren führt (siehe Diskussion) (Wagner 2005, Corvinus et al. 2005).

5.4 Mögliche Wege zu einer konstitutiven STAT3-Aktivierung in kolorektalen Karzinomen

Da sich nach den bisherigen Ergebnissen die Frage nach dem Entstehungsmechanismus der STAT-Aktivierung im kolorektalen Karzinom stellt, wird sich der letzte Abschnitt ansatzweise mit dieser Thematik auseinandersetzen. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien mit möglichen Aktivatoren von STAT3 stimuliert und im Anschluß auf STAT3-DNA-Bindung mittels EMSA untersucht. Da in der Literatur auch eine Aktivierung von STAT3 in Tumorzellen beschrieben ist, die durch vermehrte Zell-Zell-Kontakte induziert wird, wurde auch dieser STAT3-Aktivierungsmechanismus untersucht (Vultur et al. 2004).

5.4.1 Untersuchungen zur zytokinabhängigen STAT3-Aktivierung in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms

In *Abbildung 25 (Seite 77)* sind die DNA-Bindungsanalysen der 4 Zelllinien CoGa1, CoGa2, CoGa3 und CoGa12 nach Stimulation mit Zytokinen der IL-6 Familie und IFN- γ zusammengestellt. Die Wirkungsweise des STAT1 nach Aktivierung durch IFN- γ wurde bereits erläutert (siehe Kapitel 6.2.1). Die Zytokine der IL-6 Familie aktivieren über die gemeinsame gp130-Rezeptorkette STAT3 (Heinrich et al. 1998). In den gezeigten Zellen kommt es ausschließlich nach IL-6-Stimulation zur Aktivierung und DNA-Bindung von STAT3. IFN- γ aktiviert in allen Zelllinien STAT1.

Diese Ergebnisse sind mit vorangegangenen Arbeiten konsistent, in denen gezeigt wurde, daß STAT3 nach IL-6-, aber nicht nach LIF- und OSM-Stimulation der Kolonkarzinomzelllinien HT-29, CACO2 und SW480 aktiviert wird. IFN- γ führt auch in diesen Zelllinien zur STAT1 Aktivierung (Orth 2003, Corvinus et al. 2005).

Bisher nicht studierte Kandidaten für eine STAT3-Aktivierung sind die Wachstumsfaktoren EGF und VEGF. Beide können in unterschiedlichen Zelltypen STAT3 aktivieren und spielen im kolorektalen Karzinom eine besondere Rolle: Die inhibitorischen Antikörper gegen beide Faktoren erhielten 2004 die Zulassung zur Tumorthherapie des Kolon- und Rektumkarzinoms im metastasierten Stadium (Cunningham et al. 2004, Vanhoefer 2003). Eine Westernblotanalyse konnte zeigen, daß sowohl die Stimulation mit EGF als auch VEGF in allen untersuchten Zelllinien dieser Arbeit zu einer signifikanten STAT3-Phosphorylierung führte. Diese war jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt als z.B. nach Stimulation mit IL-6 (Daten nicht gezeigt).

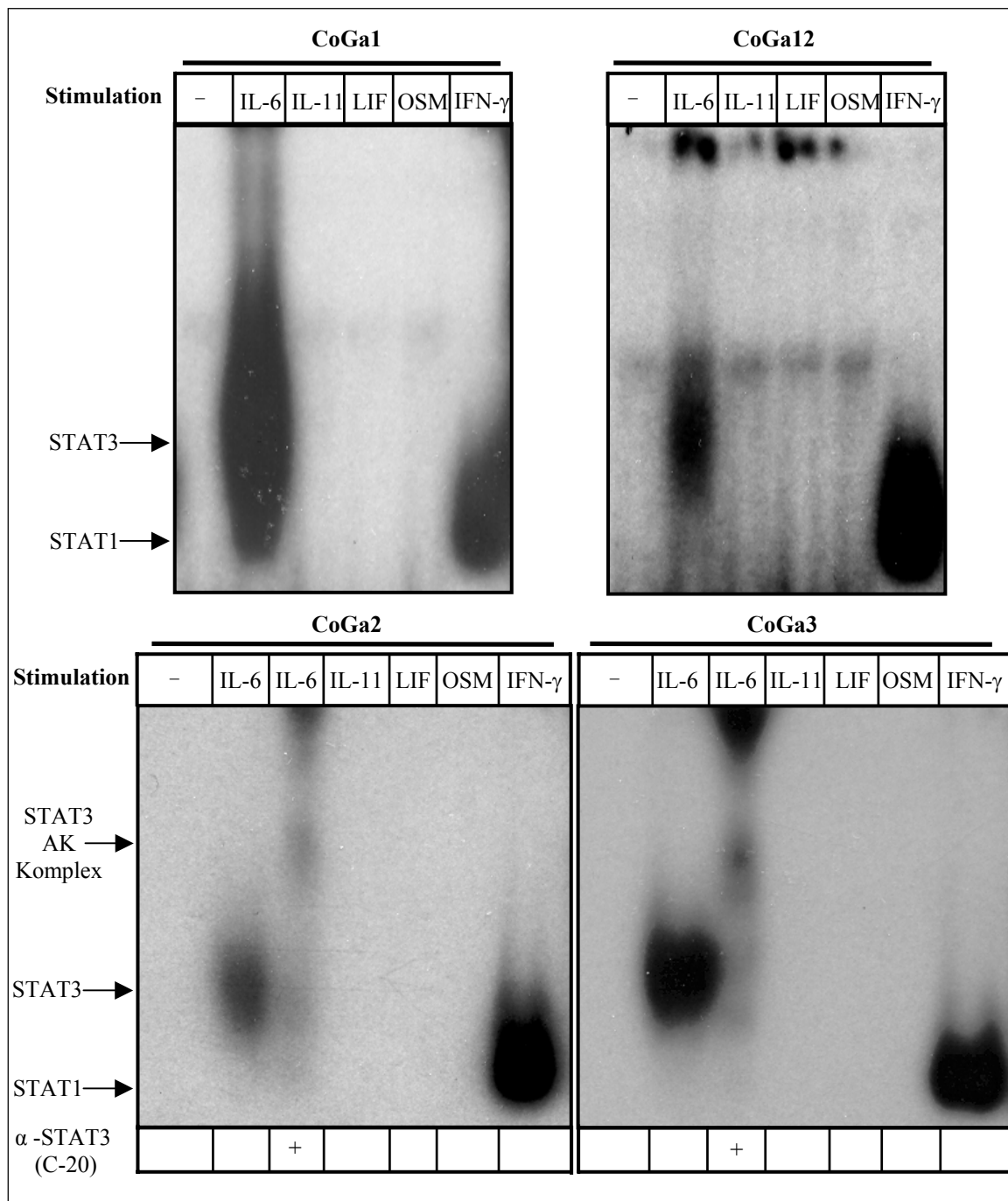


Abb.25 STAT-DNA-Bindungsaktivität der CoGa-Zelllinien nach Zytokinstimulationen

Die 4 verschiedenen Zelllinien wurden über Nacht serumfrei kultiviert und am Folgetag mit 20 ng/ml des jeweiligen Zytokins für 30 Minuten stimuliert. Sie wurden mit WCE-Puffer zu Zellextrakten weiterverarbeitet und wie in den zuvor gezeigten DNA-Bundungsanalysen nach einer Proteinbestimmung zusammen mit dem DNA-Bindungselement SIEm67 auf einem 6%-igem Acrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spezifität der STAT3-Banden wurde in den Extrakten der IL-6-Stimulierten CoGa2- und CoGa3-Zellen mit dem α -STAT3-Antikörper c-20 (Santa Cruz) nachgewiesen. Die Expositionszeit betrug 24 h (weitere Details siehe auch Abb.5 und 15A).

5.4.2 Modifizierung der STAT3-Aktivität in HT-29 durch forcierte Zell-Zellkontakte

Führt man die Erkenntnisse aus den bisherigen Ergebnissen zusammen, so findet man in 16 Primärtumoren und im nativen Gewebe zweier Zelllinien STAT3-Aktivität. In einer Gesamtanzahl von 7 untersuchten Zelllinien des kolorektalen Karzinoms konnte keine Bindung von STAT3 an DNA nachgewiesen werden. Eine Transplantation von HT-29 in Nacktmäuse führte wiederum zu STAT3-Aktivierung. Ob es sich bei diesen Aktivierungen um parakrine oder autokrine Mechanismen handelt, bleibt fraglich. Geht man von einer autokrinen STAT-3-Aktivierung aus, so verlieren die Zellen diese Eigenschaft unter Zellkulturbedingungen. Es gibt Hinweise auf einen STAT3-aktivierenden Mechanismus durch vermehrte Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Vultur et al. 2004), so daß eine mögliche Ursache für die Inaktivierung von STAT3 in Zellkultur der Verlust von Zell-Zell-Kontakten ist. HT-29 wächst in Gewebekulturschalen meist einschichtig. Da das Wachstum von Tumoren in der Regel ein dreidimensionaler Prozeß ist, lassen sich diese Bedingungen nicht auf primäres Tumorgewebe übertragen. Daher wurden HT-29-Zellen für 4 Tage auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert. HT-29 verliert unter dieser Bedingung seine Polarität, die Zellen werden rund und verlieren ihre Adhäsion mit dem Boden der Kulturschale. Der Großteil der Zellen schwimmt im Medium und bildet große dreidimensionale Konglomerate.

Abbildung 26 (Seite 80) zeigt, daß kolorektale Tumorzellen der Zelllinie HT-29 tatsächlich unter Kultivierung auf unbeschichteten Zellkulturoberflächen STAT3 aktivieren. Hierzu wurden in **A** sowohl STAT3 überexprimierende und mit dominant negativem STAT3 transduzierte HT-29-Zellen als auch die untransduzierte parentale Zelllinie HT-29 für 4 Tage auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Dies führt in untransduzierten Zellen zu einer mäßigen und in Zellen, die mit dem STAT3-Wildtyp transduziert wurden, zu einer starken STAT3-Aktivierung. Das dominant negative STAT3-Konstrukt verhindert hingegen vollständig eine STAT3-DNA-Bindung. Alle gezeigten HT-29-Varianten zeigen unter herkömmlicher Kultivierung in Gewebekulturschalen (G.K.) keine STAT3-Aktivität (jeweils erste Spur). In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit einer autokrinen STAT3-Aktivierung genauer überprüft. Um dies zu klären wurde das Zellkulturmedium der in **A** verwendeten Zelllinien für Stimulationen gesammelt und verwendet.

In **B** wurden jeweils HT-29 w.t. STAT3 und die parentale Zelllinie mit den Kulturüberständen aus **A** inkubiert. *Abbildung 26 B* zeigt in einem Western Blot, daß es hierbei zu STAT3-Aktivierung kommt. Daraus kann gefolgert werden, daß HT-29-Zellen unter Kultivierung auf

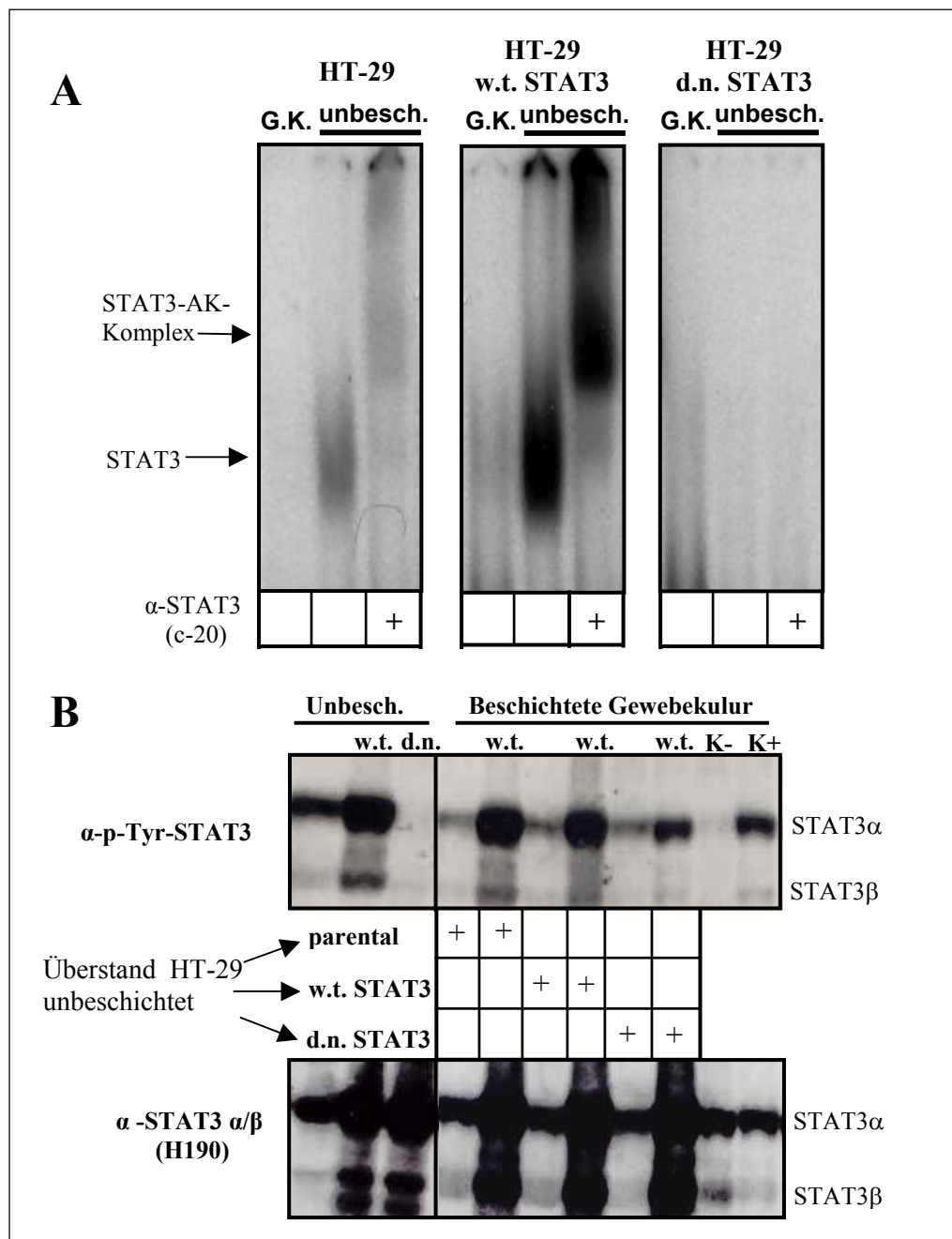


Abb.26 Untersuchungen zum Einfluß forcierter Zell-Zell-Kontakte auf die STAT3-Aktivität in HT-29-Zellen

A STAT-DNA-Bindungsanalyse der Zelllinie HT-29 unter herkömmlichen Kulturbedingungen in für die Gewebekultur üblichen, mit Kollagen beschichteten Kulturflaschen (G.K.) und nach viertägigem Wachstum auf unbeschichteter Polyethylenoberfläche. **B** Die ersten drei Spuren zeigen HT-29 nach 4 Tagen Kultivierung auf unbeschichtetem Boden. Die Überstände dieser drei HT-29 Varianten wurden zur dreißigminütigen Stimulation der unter herkömmlichen Bedingungen wachsenden Zelllinien in den folgenden Spuren verwendet.

Expositionszeiten betrugen für den EMSA 14 h und den Western Blot 1,5 bzw 2,5 Minuten (weitere Details siehe Abb.5 und Abb.15)

unbeschichteten Zellkulturschalen tatsächlich einen autokrinen Faktor sezernieren. Die Kulturüberstände führen ähnlich den IL-6-Stimulationen in Abbildung 15 zu einer mäßigen STAT3-Phosphorylierung der parentalen Zellen und zu einer starken Phosphorylierung von

HT-29 w.t. STAT3. Die ersten drei Spuren des gezeigten Western Blots reproduzieren nochmals die in A gezeigten Ergebnisse.

Der Kulturüberstand von HT-29 d.n. STAT3 führt interessanterweise zu einer schwächeren STAT3-Phosphorylierung als der Überstand der parentalen Zelllinie. Dies deutet hin, daß STAT3 möglicherweise auf die Expression des sezernierten Faktors einen direkten Einfluß ausübt (siehe Diskussion).

Zusammengefaßt leiten sich aus den in Abbildung 26 gezeigten Resultaten drei Erkenntnisse her: (1) Es kommt unter der Ausbildung vermehrter Zell-Zell-Kontakte zur Aktivierung von STAT3. (2) Diese STAT3-Aktivierung wird durch einen autokrinen Faktor vermittelt. (3) Es bestehen Hinweise dafür, daß STAT3 die Expression dieses autokrinen Faktors regulieren kann.

6. Diskussion

6.1 Die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 sind in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms aktiviert

Die vorangegangenen Studien am nativen Gewebe kolorektaler Tumoren konnten in der Mehrzahl der Fälle (16 von 17) eine STAT3-Aktivierung durch den Nachweis von STAT3-Tyrosinphosphorylierung, -DNA-Bindung und -Kernlokalisation zeigen. Diese Ergebnisse sind mit vorangegangenen Untersuchungen aus diesem Labor konsistent (Orth 2003). Sie dokumentieren erstmalig STAT3-Aktivierung im nativen Gewebe des kolorektalen Karzinoms und widmen sich der Frage nach deren Ursprung und Funktion anhand der Analyse von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien (Corvinus et al. 2005). Somit schließt sich das kolorektale Karzinom einer Reihe von STAT3-aktiven Tumoren an, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, Kopf- und Hals-Karzinom, Prostatakarzinom oder dem Chorionkarzinom, an (Watson und Miller 1995, Grandis et al. 2000, Campbell et al. 2001, Corvinus et al. 2003).

Die relativ geringe Anzahl untersuchter Tumorproben läßt nur sehr bedingt statistische Aussagen zu, Korrelationen zwischen STAT3-Aktivität und Tumorgroße, TNM-Stadium oder Prognose lieferten keine eindeutigen Erkenntnisse (Orth 2003). In mehreren Studien mit großen Fallzahlen konnte jedoch gezeigt werden, daß STAT3-Aktivität in verschiedenen Tumoren, wie z.B. in der Akuten Myeloischen Leukämie (AML), im Nierenzellkarzinom und Kopf- und Hals-Karzinom mit ungünstiger Prognose assoziiert ist (Benekli et al. 2002, Horiguchi et al. 2002, Masuda et al. 2002). Eine Korrelation zwischen STAT3-Aktivierung und Tumorgrad konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da ausschließlich G2-Tumoren zur Verfügung standen. Vor allem eine longitudinale Untersuchung einer größeren Patientenpopulation könnte weitere Schlüsse über Zusammenhänge zwischen STAT3-Aktivität und Prognose zulassen (siehe hierzu auch Kapitel 6.4). Hierfür könnte die Methode des Tissue-Microarrays besonders interessant sein. Dabei werden aus mehreren hundert Paraffinblöcken wenige Millimeter große Gewebezylinder entnommen und nebeneinander auf einen Paraffinblock transferiert. Ein Schnitt durch einen solchen Block stellt mehrere hundert Gewebeproben nebeneinander zur immunhistologischen Untersuchung dar (Kononen et al. 1998, Rimm et al. 2001).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde auch das Tumorrandgewebe von kolorektalen Karzinomen in die Untersuchungen einbezogen, da für mehrere Tumorarten, wie z.B. das Mammakarzinom, eine spezifische STAT3-Aktivierung bekannt ist, die sich auf den Tumor beschränkt und nicht im gesunden Gewebe nachweisbar ist (Watson und Miller 1995). Die vergleichenden Untersuchungen zur STAT3-Aktivität in Tumor- und Randgewebe aus dieser Arbeit ergaben kein eindeutiges Bild. Hierbei war nur in 5 der 17 untersuchten Gewebeproben ein klarer Unterschied zwischen starker STAT3-Aktivität in Tumorzellen und geringer Aktivierung in Zellen des korrespondierenden Randgewebes nachweisbar. Eine ähnliche Situation beschreiben Dhir et al. in Untersuchungen am Prostatakarzinom und seinem Randgewebe (Dhir et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern für die Relevanz einer STAT3-Aktivität in den maligne transformierten Zellen des kolorektalen Karzinoms eine klare Evidenz. Als Ursache dafür, daß sich die STAT3-Aktivität der untersuchten Gewebeproben nicht in einem durchgängigen Unterschied zwischen Tumor- und Randgewebe widerspiegelt, können mehrere Aspekte eine Rolle spielen. Möglicherweise liegen im Tumorrand schon prä-maligne Veränderungen vor, die sich lichtmikroskopisch noch nicht erkennen lassen, aber bereits biochemisch anhand der STAT3-Aktivität nachweisbar sind (Dhir et al. 2002).

Geht man von einer zytokinvermittelten STAT3-Aktivierung aus, so könnten im Tumorgewebe sezernierte Faktoren in das angrenzende Gewebe diffundieren und dort ebenso wie im Tumor ihre Wirkung entfalten. Hierfür wäre auch ein Einfluß der tumorinduzierten Entzündungsreaktion denkbar, die sich teilweise auf das nicht-neoplastische Gewebe ausdehnt (siehe auch Kapitel 6.3). Es finden sich in der gesunden Darmschleimhaut von Tumorpatienten jedoch auch indirekt tumorassoziierte Entzündungen, z.B. durch Komplikationen wie Stenosen. Um die STAT-Aktivität in Zellen einer unveränderten und gesunden Kolonmukosa zu untersuchen, müßte im Idealfall Gewebe eines gesunden Probanden verwendet werden. Daher gestaltet sich die Untersuchung eines derartigen Gewebes prinzipiell schwierig.

Es gibt jedoch auch Hinweise für eine physiologische Rolle der STAT3-Aktivität in der untransformierten Darmschleimhaut. So werden Zellen der Darmmukosa innerhalb von durchschnittlich 2-5 Tagen vollständig ausgetauscht. Es handelt sich daher um ein Gewebe mit ausgeprägter regenerativer Potenz (Junqueira und Carneiro 1996). Die nachgewiesene STAT3-Aktivität im nicht-neoplastischen Gewebe könnte daher durch die Transkription von proliferationsfördernden oder zelldifferenzierenden Genen eine physiologische Rolle bei diesen dauerhaften regenerativen Prozessen spielen. Hinweise hierfür liefern unter anderem

Ergebnisse der selektiven STAT3-Inaktivierung im Kolonepithel von Mäusen. Diese führte durch Störung der Schleimhauthomöostase zur bakteriellen Translokation und induzierte eine fulminante Enterokolitis (Alonzi et al. 2004). Eine Relevanz der STAT3-Aktivität in den Entzündungszellen des Dickdarms zeigte die genetische STAT3-Depletion in der myeloischen Zellreihe von Mäusen. Diese führte zu einer chronischen Enterokolitis (Kobayashi et al. 2003).

Für eine Zell- und Gewebespezifität von STAT3 spricht auch die Tatsache, daß es neben den bereits in der Einleitung erwähnten fördernden Effekten von STAT3 auf die Zellzyklusprogression, Invasivität, Metastasierung und Progredienz vieler Tumoren auch apoptotische und antiproliferative Eigenschaften von STAT3 beschrieben sind. So induziert STAT3 beispielsweise bei der Involution der Brustdrüse Apoptose und bewirkt in Keratinozyten, Zellen der myeloischen Reihe und im frühen Stadium des malignen Melanoms einen Übergang von Proliferation zur Zelldifferenzierung (Levy und Lee 2002, Hauser et al. 1998, Minami et al. 1996, Florenes et al. 1999). Man geht daher von einer gewebeabhängigen Aktivierung von STAT3-Zielgenen aus, so daß STAT3 im Tumorrandgewebe möglicherweise andere Funktionen erfüllt als im Tumor. Dennoch scheint STAT3 in der überwiegenden Zahl untersuchter Tumorzellen auf das Tumorstadium fördernd zu wirken.

Es ist davon auszugehen, daß sich das genetische Programm der Zellen des angrenzenden Gewebes von denen des Karzinoms unterscheidet. So sind in der Literatur mehrere dysregulierte Signalprozesse beschrieben, die für Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms charakteristisch sind, z.B. der Wnt-Signalweg (siehe auch Einleitung). Dieser interagiert mit dem STAT3-Signalweg auf mehreren Ebenen. So können sowohl das mutierte APC-Protein (Norris et al. 2000) als auch die Transkriptionsfaktoren Tcf-4 und Lef-4 (Yamashita et al. 2002) mit STAT3 interagieren und somit die Expression von Genen, die den Zellzyklus beeinflussen (z.B. c-myc oder Cyclin D), modulieren (Kolligs et al. 2002). Es wurden auch STAT3-Bindungssequenzen in der Promotorregion des murinen Wnt-Aktivatoren Frp (Frizzled-Related Peptide) gefunden, so daß STAT3 möglicherweise die Aktivität des Wnt-Signalweges verstärken kann (Wong et al. 2003). Weiterhin konnte in Mammakarzinomzelllinien gezeigt werden, daß das in den meisten kolorektalen Karzinomen mutierte Tumorsuppressorgen p53 in seiner wildtypischen Form Phosphorylierung und Transkription von STAT3 reduziert (Lin et al. 2002).

Da auch Wechselwirkungen zwischen STAT3 und onkogenen Faktoren der AP-1-Familie bekannt sind, wurde während dieser Arbeit auch die DNA-Bindung von Faktoren der AP-1-Familie an ihre Konsensus-Sequenz im Tumorgewebe untersucht. Es konnte jedoch nur in

weniger als der Hälfte der untersuchten Tumoren AP-1-DNA-Bindung nachgewiesen werden (nicht gezeigt, siehe Tabelle 5). Direkte Interaktionen von AP-1-Proteinen und STAT3 sind vor allem für c-Jun und c-Fos beschrieben (Schaefer et al. 1995, Coffey et al. 1995, Schuringa et al. 2001). Auch auf Expressionsebene beeinflussen sich beide Transkriptionsfaktorfamilien gegenseitig. So reguliert beispielsweise STAT3 die Expression der AP-1-Faktoren c-Fos und JunB (Joo et al. 2004, Sjin et al. 1999).

Es konnte auch gezeigt werden, daß STAT3 durch Expressionskontrolle z.B. des Androgenrezeptors im Prostatakarzinom (Chen et al. 2000) oder des Östrogenrezeptors in Zellen des Mammakarzinoms (Yamamoto et al. 2000) Signalwege der Steroidhormone beeinflussen kann. Eine direkte Interaktion des Glukokortikoidrezeptors mit STAT3 konnte durch Koimmunpräzipitation belegt werden (Zhang et al. 1997).

Da die Wechselbeziehungen von STAT3 mit anderen Signalwegen sehr vielseitig sind, wird deutlich, daß der jeweilige Zelltyp STAT3 in seiner Funktion beeinflussen kann. Daher sind Unterschiede der STAT3-Funktion zwischen Tumor- und Randgewebe wahrscheinlich. Die Analyse derartiger Zusammenhänge im kolorektalen Karzinom und in der nicht-transformierten Darmschleimhaut erfordert den Nachweis der Aktivität von STAT3-Interaktionspartnern in den untersuchten Proben und gegebenenfalls deren spezifische Inhibition in Zellkultur.

Neben der nachgewiesenen STAT3-Aktivität fand sich auch in mehreren Fällen sowohl im Tumor als auch im Randgewebe DNA-Bindung von STAT1. Obwohl in der Literatur keine malignitätsfördernden Eigenschaften einer STAT1-Aktivität beschrieben sind (Huang et al. 2002), wurde sie in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. Hierzu zählen z.B. das Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Kopf- und Hals-Karzinom und Gliome (Watson und Miller 1995, Cattaneo et al. 1998, Arany et al. 2003, Seki et al. 2004).

STAT1 wird vor allem durch Interferone, wie z.B. IFN- γ , aktiviert und ist daher ein wichtiger Faktor bei der antiviralen Immunabwehr (siehe auch Einleitung). Es wirkt durch die Induktion von antiproliferativen und proapoptotischen Genen auf Tumorzellen wachstumsinhibierend. So vermittelt STAT1 über die Expression des Fas-Rezeptors den programmierten Zelltod und verhindert über die Transkription von Cyklinkinaseinhibitoren das Fortschreiten des Zellzyklus (Chin et al. 1996, O'Shea et al. 2002). Es gibt Hinweise, daß sich STAT1-Aktivität günstig auf die Prognose des Mammakarzinoms auswirkt (Widschwendter et al. 2002) (vgl. auch Kapitel 6.4). IFN- γ induziert in den Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW-480 die

Transkription des proapoptotischen fas-Gens (Xu et al. 1998, Bergmann-Leitner und Abrams 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß IFN- γ STAT1 in allen verwendeten Zelllinien aktiviert und auch das Proliferationsverhalten negativ beeinflußt, aber nicht zum apoptotischen Untergang führt. Die Wirkung von IFN- γ auf das Proliferationsverhalten der CoGa3-Zelllinie unterschied sich von den anderen untersuchten Zelllinien; ein anfänglicher Wachstumsrückgang wurde nach wenigen Tagen kompensiert. Da der Primärtumor dieser Zelllinie sowohl STAT1- als auch STAT3-Aktivierung zeigte, wären hier Zusammenhänge denkbar. Möglicherweise verfügt CoGa3 über Kompensationsmechanismen, die einem wachstumsverlangsamenden Effekt von IFN- γ entgegenwirken. Experimentell könnten hier Zeitreihen der STAT1-Aktivität und der verschiedenen intrazellulären STAT-Inaktivatoren (z.B. SOCS und PIAS) unter IFN- γ -Stimulation über mehrere Tage sehr aufschlußreich sein.

Es wird vermutet, daß STAT1 in Tumoren parakrin durch immunologische Prozesse während der Tumorabwehr und der induzierten Entzündungsreaktion aktiviert wird (Levy und Gilliland 2000). Da bestimmte Faktoten sowohl STAT3 als auch STAT1 aktivieren, z.B. EGF oder PDGF, könnten sie eventuell für die Koaktivität dieser STAT-Proteine in einigen untersuchten Tumorproben verantwortlich sein (Bromberg et al. 1998, Choudhury et al. 1996).

Viele Fragen zur Rolle der STAT1-Aktivität in maligne transformierten Zellen bleiben offen. Die Literatur verweist an dieser Stelle auf die erheblich stärkeren proliferativen Effekte von STAT3 und ordnet diesen die Wirkung der STAT1-Aktivität unter (Bowman et al. 2000). Dies wird z.B. anhand des direkt antagonistischen Effektes von STAT3 am Promotor des Fas-Rezeptors diskutiert (Battle und Frank 2002, Ivanov et al. 2001).

Genauere Untersuchungen dieser Thematik sind bis heute kaum veröffentlicht und bieten einen Ansatz für weitere aufschlußreiche Experimente. Es ist zu vermuten, daß auch die Wirkung von STAT1 gewebespezifisch ist und vom genetischen Programm der Zellen beeinflußt wird. Auch eine Modulation der Signalprozesse von STAT1 und STAT3, z.B. durch die Bildung von Heterodimeren, wäre denkbar. Über die Bindung von STAT1/3 an bestimmte Promotoren existieren nur wenige Untersuchungen. So führen beispielsweise nur bestimmte Zytokine in Kooperation mit STAT1 zu einer DNA-Bindung an spezifische STAT1/3 Bindungssequenzen (Mynard et al. 2002). Zur Analyse solcher Interaktionen bieten sich z.B. Kointransfektionen von heterologen STAT1- und STAT3-Varianten an.

6.2 *Aktiviertes STAT3 führt zu einer Zunahme der Malignität kolorektaler Tumorzelllinien*

Um den Einfluß der zuvor nachgewiesenen STAT3-Aktivität auf die Eigenschaften kolorektaler Tumoren zu untersuchen, wurden modellhaft mehrere Zelllinien des kolorektalen Karzinoms studiert. Für diese Studien stand das primäre Tumorgewebe, aus dem die analysierten Zelllinien CoGa1, CoGa2 und CoGa3 entwickelt wurden, zur Verfügung. Dieser besonders günstige Umstand ermöglichte es, eine STAT3-DNA-Bindungsanalyse durchzuführen. So zeigte das native Gewebe von CoGa1 STAT1-, von CoGa2 STAT3- und von CoGa3 STAT1- und STAT3-Aktivität. Erstaunlicherweise ließ sich nach der Kultivierung dieser Zellen weder STAT1 noch STAT3-Aktivierung nachweisen (siehe hierzu auch Kapitel 7.3).

Zur genaueren Untersuchung des Effektes von STAT3 auf die Malignität kolorektaler Tumorzelllinien wurden sie mit heterologen STAT3-Varianten transduziert. Diese können durch Überexpression (w.t. STAT3) und konstitutive Aktivierung (STAT3 c.a.) STAT3-Aktivität verstärken oder durch eine dominant negative Variante STAT3-Aktivität vermindern.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Proliferation kolorektaler Tumorzelllinien konnten zeigen, daß STAT3-Aktivierung auf das Wachstumsverhalten der Zellen einen fördernden Effekt ausübt. Hierzu wurden sowohl die parentalen Zelllinien als auch ihre transduzierten Derivate mit dem STAT3-aktivierenden Zytokin IL-6 stimuliert. Interessanterweise zeigten sowohl die STAT3-überexprimierenden Zellen (w.t. STAT3) als auch die mit dominant negativem STAT3 transfizierten Zellen (d.n. STAT3) unabhängig von einer STAT3-Aktivierung durch IL-6-Stimulation Effekte auf das Wachstumsverhalten. Obwohl eine basale STAT3-Aktivität in diesen Zelllinien nicht gefunden wurde, ist denkbar, daß es hierbei während der Kultivierung über mehrere Tage zu einer leichten STAT3-Aktivierung kommt. Die durchgeführten Analysen zur STAT3-Aktivierung (z.B. in Abb.13) wurden unter optimierten Bedingungen an ca. 80% konfluenten Zellen durchgeführt. Da z.B. in Zelllinien des Mammakarzinoms durch vermehrte Zell-Zell-Kontakte bei zunehmender Konfluenz STAT3-Aktivierung beobachtet wurde (Vultur et al. 2004), sind auch während der Proliferationsanalysen derartige Effekte denkbar (vgl. hierzu auch Kapitel 6.3).

Die Wirkung von STAT3 auf das Zellwachstum ist vielseitig. In mehreren Tumorarten konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter STAT3-Aktivität und der Induktion von Genen, die

den Zellzyklus vorantreiben, (z.B. cyclin D1 und c-myc) nachgewiesen werden (Bromberg et al. 1999, Turkson und Jove 2000). Eine direkte Korrelation zwischen STAT3-Aktivität und cyclin D1 wurde z.B. im Kopf- und Hals-Karzinom (Masuda et al. 2002) gefunden. Das von Bromberg und Darnell entwickelte konstitutiv aktive STAT3-Konstrukt führte in Fibroblasten unter anderem durch Steigerung der Expression von cyclin D1, c-myc und bcl-xL zur Transformation (Bromberg et al. 1999, Kiuchi et al. 1999). Auch die gezielte Inaktivierung von STAT3, z.B. durch genetische Depletion, durch dominant negative Varianten oder durch spezifische Inhibitoren, konnte den Einfluß von STAT3 auf den Zellzyklus bestätigen (Takeda et al. 1998, Bromberg et al. 1998, Bharti et al. 2003).

Des weiteren ist eine Wirkung von STAT3 auf die Regulation des programmierten Zelltodes durch Aktivierung von antiapoptotischen Genen, wie z.B. bcl-2, mcl-1, bcl-xL und survivin, bekannt (Catlett-Falcone et al. 1999, Fukada et al. 1996, Puthier et al. 1999, Mahboubi et al. 2001). So konnte der Zusammenhang zwischen der Expression dieser Gene und STAT3-Aktivierung im Mammakarzinom, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom belegt werden (Bromberg 2000, Song et al. 2003). Außerdem können Mammakarzinomzelllinien durch eine STAT3-abhängige bcl-2 Induktion Resistenzen gegen Chemotherapeutika entwickeln (Real et al. 2002). Vorläufige Ergebnisse aus diesem Labor zeigten auch im kolorektalen Karzinom die Expression von bcl-2 (Orth 2003). STAT3 kann auch durch die Repression proapoptotischer Gene, wie z.B. dem Fas-Rezeptor im malignen Melanom, die Apoptose negativ beeinflussen (Ivanov et al. 2001). Mehrere Experimente an Zelllinien mit dominant negativem STAT3 und STAT3-Inhibitoren konnten den Einfluß von STAT3 auf den programmierten Zelltod belegen (Bromberg et al. 1998, Dalton und Jove 1999).

Um einen klaren Zusammenhang zwischen STAT3-Aktivität und Apoptose oder der Progression des Zellzyklus im kolorektalen Karzinom zu beweisen, sind weiterführende Experimente nötig. Hierzu müßte die Expression oben genannter Gene im Patientenmaterial z.B. auf Proteinebene durch Western Blot und Immunhistologie oder durch Quantifizierung ihrer RNA untersucht werden. Anhand der Zelllinien und ihrer transfizierten Derivate könnte der direkte Effekt der STAT3-Aktivität auf das Expressionsmuster dieser Gene analysiert werden. Weitere Erkenntnisse über die Wirkung von STAT3 auf die Apoptose könnte man durch Untersuchung der Anoikis erlangen. Mit Anoikis wird das Phänomen bezeichnet, bei dem durch Zellkultivierung auf glatten Oberflächen Apoptose induziert wird. Bei einer STAT3-abhängigen Regulation des programmierten Zelltodes müßte es besonders zwischen den STAT3-überexprimierenden Zellen (w.t. STAT3) und den mit dem dominant negativen

STAT3-Konstrukt transduzierten Zellen (d.n. STAT3) zu einer unterschiedlich starken Apoptoseinduktion kommen.

Ein entscheidendes Merkmal maligner Tumoren ist das invasive Wachstum. Es wird vor allem durch die Motilität und durch infiltrative Mechanismen der Tumorzellen geprägt. Bisher ist relativ wenig über die Rolle aberranter STAT3-Aktivität bei der Ausprägung dieser Eigenschaften bekannt, obwohl viele Befunde hier wichtige Zusammenhänge nahe legen.

Bei der Entwicklung des Zebrafisches ist STAT3 während der Gastrulation entscheidender Mediator der Zellbeweglichkeit (Yamashita et al. 2002). STAT3 ist an der Kontrolle der Migration von Keratinozyten beteiligt (Yahata et al. 2003). In Zelllinien des Mammakarzinoms fördert STAT3 die krebsassoziierte Zellmigration (Badache und Hynes 2001, Elliott et al. 2002). LIF, ein Zytokin der IL-6-Familie, vermag STAT3-abhängig die Migration und das invasive Wachstum von Trophoblasten und Chorionkarzinomzelllinien positiv zu beeinflussen (Fitzgerald et al. 2005). Weiterführende Experimente mit den in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen STAT3-Aktivität und Tumorzellmigration. So konnten in diesem Labor deutliche Effekte der STAT3-Aktivierung auf das Migrationsverhalten und die Invasivität von HT-29 und CoGa1 Zellen im Matrigel-Invasionsassay nachgewiesen werden (Tsareva 2005, Tsareva et al. 2005).

STAT3 ist eines der intrazellulären Substrate des HGF- (Hepatocyte Growth Factor) Rezeptors c-Met, einer onkogenen Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Es vermittelt c-Met-gesteuerte Zellmotilität und kann Zellinvasivität und Metastasierungspotential von Tumorzellen verstärken (Boccaccio et al. 1998, Zhang et al. 2002). Da c-Met in den meisten kolorektalen Karzinomen überexprimiert wird (Hiscox et al. 1997), könnte STAT3 durch einen Verlust der Kontaktinhibitor und Förderung der Zellmigration die Invasivität begünstigen (Hiscox et al. 1997, Di Renzo et al. 1995, Umeki et al. 1999, Elliott et al. 2002). An Fibroblasten konnte in diesem Labor eine Funktion von STAT3 bei der c-Met induzierten Invasivität nachgewiesen werden (Cramer et al. 2005).

Eine wichtige Rolle während des invasiven Wachstums vieler Tumoren spielt die verstärkte Aktivität matrixabbauender Proteasen. So beeinflusst STAT3 beispielsweise durch die vermehrte Expression von MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) die Transformation von Brustepithelien (Dechow et al. 2004). Ähnlich aufschlußreich waren Erkenntnisse über die Expression verschiedener Proteasen in den hier untersuchten Tumorproben des CRC (Tsareva 2005). Besonders die Expression von MMP-1 korrelierte mit der untersuchten STAT3-Aktivität. Immunhistologisch ließen sich STAT3 und MMP-1 im nativen Gewebe

kolokalisieren. Offenbar kann STAT3 in HT-29-Zellen die Transkription von MMP-1 steigern (Tsareva et al. 2005). Interessanterweise induziert der STAT3-aktivierende Wachstumsfaktor HGF in der kolorektalen Karzinomzelllinie CaCo2 die Produktion der Metalloproteinasen MMP-1, -2 und -9. Gegen HGF gerichtete Antikörper konnten die Proteaseexpression und die Invasivität von Tumorzellen vermindern (Kermorgant et al. 2001). Erhöhte MMP-1-Expression wurde im kolorektalen Karzinom mit Metastasierung und schlechterer Prognose korreliert (Curran und Murray 1999, Shiozawa et al. 2000, Horiuchi et al. 2003).

In dieser Arbeit wurden direkte tumorigene Eigenschaften von STAT3 im Mausmodell untersucht. Überraschenderweise war trotz unterschiedlicher STAT3-Expression der implantierten Zellen in allen Gruppen sowohl STAT3-DNA-Bindung als auch Phosphorylierung auf ungefähr gleichem, relativ hohem Niveau nachweisbar. Dies läßt vermuten, daß die induzierte STAT3-Aktivierung durch begrenzende Mechanismen in allen Gruppen auf ein ähnliches Niveau reguliert wird.

Es sind mehrere Regulationsmechanismen der Aktivitätskontrolle von STAT3 auf unterschiedlichen Ebenen bekannt. Zu den spezifischen Inhibitoren des JAK/STAT-Weges gehören beispielsweise SOCS-Proteine (Suppressor of Cytokine Signaling). Sie binden über eine SH-2 Domäne an Kinasen und Zytokinrezeptoren und vermindern so die STAT3-Phosphorylierung. Da ihre Expression durch STATs reguliert wird, wirken sie im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus (Starr et al. 1997, Lieskovska et al. 2003). Für die verminderte Aktivierung von STAT3 durch Zytokine der IL-6-Familie sind vor allem SOCS-1 und -3 verantwortlich (Novak et al. 1999). In diesem Zusammenhang konnten Schuringa et al. zeigen, daß eine autokrine IL-6-Sekretion in Zellen der AML die Transkription von SOCS-1 und SOCS-3 verstärkt (Schuringa et al. 2000). Nach HGF-Stimulation von Keratinozyten kommt es zu einer verstärkten SOCS-3-Expression, die eine STAT3-Aktivierung während der Zellmigration moduliert. In Zellen des hämatopoetischen Systems vermindert SOCS-1 auch die Aktivität mehrerer STAT3-aktivierender Onkogene (Rottapel et al. 2002). Auch in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen regulieren SOCS-Proteine die STAT3-Aktivität (Suzuki et al. 2001). Bestimmte Phosphatasen, wie z.B. SHP-1 und SHP-2, die nach Stimulation Rezeptoren und Januskinasen inaktivieren, kontrollieren die Aktivität von STAT3 (Kim et al. 1998, Fischer et al. 2004). Ein anderer Weg zur Regulation der STAT3-Aktivierung ist die Internalisation von Rezeptoren (Blanchard et al. 2001, Heinrich et al. 1998, Hess et al. 2000).

Um einen Zusammenhang der gezeigten Ergebnisse im Mausmodell mit den verschiedenen Modulatoren des JAK/STAT-Signalweges zu belegen, wären weiterführende Versuche zur Quantifizierung und Aktivitätsbestimmung von SOCS-Proteinen oder SHP-Phosphatasen sinnvoll.

Einen eindeutig verstärkenden Einfluß der STAT3-Aktivität auf das Wachstum von kolorektalen Karzinomzelllinien in Nacktmäusen zeigten Ergebnisse von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. HT-29-Zellen, die mit der dominant negativen STAT3-Variante transfiziert waren, bildeten im Vergleich zur parentalen Kontrollgruppe im xenogenen Milieu kleinere Tumoren (Wagner 2005, Corvinus et al. 2005). Es wäre interessant, derartige Versuche auszubauen, indem man spezifische Inhibitoren einsetzt. So könnte man versuchen, die Entstehung von Tumoren in Nacktmäusen nach der Injektion von Kolonkarzinomzellen zu hemmen, indem man den Mäusen, im Sinne eines therapeutischen Ansatzes, den spezifischen JAK-Inhibitor AG490 (Nielsen et al. 1997) oder den STAT3-Inhibitor Cucurbitacin verabreicht. Cucurbitacin ist eine aus Kürbissen isolierte Substanz, die 2003 von Blaskovich et al. als spezifischer STAT3-Inhibitor identifiziert wurde (Blaskovich et al. 2003).

Auch der Einfluß von STAT3 auf die Metastasierung von kolorektalen Karzinomzellen ließe sich anhand eines Mausmodells untersuchen. So könnte man die mit verschiedenen STAT3-Konstrukten transfizierten Zelllinien in die Schwanzvenen von Nacktmäusen injizieren (Imai et al. 1999) und dabei den Fokus auf die Rolle von STAT3 bei der pulmonalen Metastasierung richten. Weiterführend wäre nach der Identifikation der STAT3-aktivierenden Mechanismen in kolorektalen Tumoren ein Therapieversuch im Mausmodell mit spezifischen inaktivierenden Zytokinantikörpern, wie z.B. anti-EGF und anti-VEGF, sinnvoll.

6.3 Mögliche Mechanismen der konstitutiven STAT3-Aktivität in kolorektalen Tumoren

Die gezeigten Resultate liefern Hinweise für malignitätsvermittelnde Konsequenzen der konstitutiven STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom. Besonders im Hinblick auf therapeutische Ansätze ist es von großem Interesse, die Induktionsmechanismen der STAT3-Aktivität zu ermitteln. STAT3 kann in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen durch Zytokine (z.B. IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF), Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, PDGF, VEGF) und intrazelluläre Kinasen (z.B. Src, Tel-JAK, v-abl) aktiviert werden. Wird die Aktivierung über Rezeptoren vermittelt, so kommen sowohl parakrine als auch autokrine Mechanismen in Frage (Bromberg 2001, Heinrich et al. 1998).

Für die in dieser Arbeit nachgewiesene STAT3-Aktivierung kolorektaler Tumorzellen wäre ein parakriner Mechanismus vorstellbar. Ein Großteil der STAT3-aktivierenden Zytokine kann von unterschiedlichen Entzündungszellen gebildet werden (z.B. IL-6 von Granulozyten, Monzyten, T-Zellen, natürlichen Killerzellen) (Hirano et al. 2000). Es kommen daher besonders die zahlreichen entzündlichen Prozesse im kolorektalen Tumorgewebe für die STAT3-Aktivierung in Betracht. So konnten beispielsweise Heuberval et al. Zusammenhänge zwischen der IL-6-Sekretion von Makrophagen und der Produktion des immunsuppressiven IL-10 in Kolonkarzinomzelllinien zeigen. IL-10 wird von vielen Neoplasien sezerniert, um die tumorinduzierte Entzündungsreaktion einzudämmen und somit der immunologischen Tumorabwehr zu entkommen (Herbeuval et al. 2004).

Eine direkte Korrelation zwischen Entzündungsinfiltration kolorektaler Tumoren und STAT3-Aktivierung konnte in Vorarbeiten zu diesem Projekt jedoch nicht bestätigt werden (Orth 2003). Eine Zytokinproduktion durch Stromazellen ist denkbar. Hinweise auf einen parakrinen Prozeß könnten durch den Nachweis der RNA-Expression von STAT3-aktivierenden Zytokinen und ihren Rezeptoren erhärtet werden, z.B. durch *in situ* Hybridisierung.

Hinweise auf eine autokrine Aktivierung von STAT3 liefern die gezeigten Experimente mit der Zelllinie HT-29. Obwohl bisher alle untersuchten Kolonkarzinomzelllinien unter Kulturbedingungen keine STAT3-Phosphorylierung zeigten, sezerniert HT-29 während der Kultivierung auf unbeschichteten Plastikoberflächen einen STAT3-aktivierenden Faktor. Diese Resultate deuten auf autokrine Aktivierungsmechanismen von STAT3 auch im kolorektalen Karzinom hin. Ähnliche Ergebnisse existieren bereits für Zelllinien des

Mammakarzinoms. So konnten Vultur et al. zeigen, daß in Mammakarzinomzellen unter zunehmender Konfluenz durch vermehrte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über Januskinasen STAT3 phosphoryliert wird. Ein für diese Aktivierung verantwortlicher Faktor konnte noch nicht identifiziert werden (Vultur et al. 2004).

Die gezeigten Untersuchungen liefern auch Hinweise dafür, daß STAT3 die Expression des autokrin sezernierten Faktors beeinflussen kann. Der Kulturüberstand von HT-29-Zellen, die das dominant negative STAT3-Konstrukt exprimieren und auf unbeschichteten Kulturschalen wachsen, führte zu einer schwächeren STAT3-Aktivierung. Es wäre vorstellbar, daß STAT3 hierzu direkt an den Promotor dieses Faktors bindet, um ihn zu aktivieren. Ein derartiger Mechanismus konnte z.B. für den Wachstumsfaktor VEGF nachgewiesen werden (Rivat et al. 2005). Von großem Interesse sind in diesem Kontext auch die Ergebnisse von Narimatsu et al., die zeigen, daß STAT3 auch an den STAT3-Promotor bindet. Daher kann STAT3 auch seine eigene Aktivität durch erhöhte Expression verstärken (Narimatsu et al. 2001).

Derartige perpetuierende Aktivierungsschleifen könnten in HT-29-Zellen anhand von Reporterassays nachgewiesen werden. Die STAT3-Abhängigkeit könnten STAT3-Inhibitoren, wie z.B. Cucurbitacin, belegen.

Es liegt die Vermutung nahe, daß sich Tumorzellen nach der Entnahme aus ihrem Ursprungsgewebe unter herkömmlichen Kulturbedingungen verändern und bestimmte tumorspezifische Eigenschaften verlieren. Dies konnten z.B. Analysen zur Genexpression von soliden Tumoren und Zelllinien bestätigen (Szakacs und Gottesmann 2004). So verlieren Zellen des kolorektalen Karzinoms unter Zellkulturbedingungen ihre STAT3-Aktivität.

Von den in dieser Arbeit studierten Zytokinen aktivierte ausschließlich IL-6 STAT3 in kolorektalen Karzinomzelllinien. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das auch auf autokrinem Weg über STAT3 das Tumorwachstum vorantreiben kann. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise für Tumoren der hämatopoetischen Reihe, wie der Akuten Myeloischen Leukämie oder dem Hodgkin Lymphom, beschrieben (Schuringa et al. 2000, Kube et al. 2001). Aber auch bei soliden Tumoren, wie z.B. dem Prostatakarzinom (Lou et al. 2000, Giri et al. 2001), Zervixkarzinom (Hess et al. 2000), Kopf- und Hals-Karzinom (Sriuranpong et al. 2003), Nierenzellkarzinom (Horiguchi et al. 2002), Gliomen (Takanaga et al. 2004) und dem Kaposi Sarkom (Meads und Medveczky 2004) spielt eine autokrin induzierte STAT3-Aktivierung durch IL-6 eine Rolle. In Zellen des Mammakarzinoms führt die Kooperation von autokrin sezerniertem EGF und IL-6 zu einer Zunahme der Zellmigration und Invasivität (Badache und Hynes 2001). Auch im primären

Tumorgewebe des Ösophaguskarzinoms spielt wahrscheinlich autokrine IL-6-Stimulation eine Rolle bei der STAT3-Aktivierung. Hier konnte sowohl die Expression von IL-6 als auch des IL-6-Rezeptors im nativen Gewebe nachgewiesen werden (Leu et al. 2003). Ähnliche Hinweise über IL-6 auf Expressionsebene liegen auch für das kolorektale Karzinom vor (Shirota et al. 1990).

Ein weiterer wichtiger STAT3-Aktivator ist der Wachstumsfaktor EGF (Endothelial Growth Factor) (Zhong et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, daß autokrine EGF-Sekretion in Mammakarzinomzellen über STAT3-Aktivierung zu einer Zunahme der Proliferationsrate führt (Sartor et al. 1997). Eine ähnliche EGF-Schleife ist auch für Zellen des Bronchialkarzinoms bekannt (Fernandes et al. 1999). Im Kontext dieser Arbeit führte EGF-Stimulation von kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer wenn auch schwachen STAT3-Phosphorylierung (nicht gezeigt). Besonders interessant ist, daß auch in der Literatur autokrine EGF-Schleifen im kolorektalen Karzinom diskutiert werden (Ciardiello et al. 1991, Culouscou et al. 1988).

Der ebenso über Rezeptortyrosinkinasen STAT3-aktivierende Faktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) wirkt vor allem auf endotheliale Zellen und spielt bei der Tumervaskularisation eine wichtige Rolle (Bartoli et al. 2000, Enaida et al. 1999). VEGF ist daher für die Oxygenierung und für ein ausreichendes Nährstoffangebot des Tumors mit verantwortlich. Es konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen VEGF-induzierter STAT3-Aktivität, Migration und Röhrenbildung endothelialer Zellen hergestellt werden (Yahata et al. 2003, Niu et al. 2002). Autokrine VEGF-Schleifen sind in Hirntumoren und im Pankreaskarzinom (Wei et al. 2003), in Zellen des Zervixkarzinoms (Wei et al. 2003), in Ovarialtumoren (Chen et al. 2004) sowie im Kopf- und Hals-Karzinom beschrieben worden (Schaefer et al. 2002, Niu et al. 2002). Das VEGF-Gen gehört auch zu den STAT3-Zielgenen, so daß STAT3 die VEGF-Expression in Zellen kontrollieren kann (Funamoto et al. 2000). Da wiederum VEGF auch STAT3 aktiviert, kann sich ein autokriner VEGF-Mechanismus im Sinne einer perpetuierenden VEGF-STAT3-Schleife kontinuierlich verstärken, wie z.B. in Gliomen und dem Medulloblastom (Schaefer et al. 2002). Ähnliche Mechanismen wurden auch im Zervixkarzinom und im Pankreaskarzinom gefunden (Wei et al. 2003, Wei et al. 2003). Auch für das kolorektale Karzinom gibt es Hinweise auf autokrine Mechanismen durch VEGF-Synthese. So wurden vor allem im metastasierten Stadium erhöhte VEGF- und VEGF-Rezeptor-Expression gefunden (Warren et al. 1995). Die STAT3-vermittelte

Tumordinvasion nach VEGF-Stimulation konnte bereits durch STAT3 siRNA in einer Kolonkarzinomzelllinie gehemmt werden (Rivat et al. 2005). Auch im Rahmen dieser Arbeit führten Stimulationen in allen untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer, wenn auch schwachen, STAT3-Phosphorylierung durch VEGF (nicht gezeigt).

Rezeptorunabhängige Kinasen, wie z.B. Src, können in Zellen STAT3 phosphorylieren (Bowman et al. 2000, Cao et al. 1996). Erhöhte Src-Expression konnte mit Tumorprogression und Metastasierung kolorektaler Karzinome korreliert werden (Talamonti et al. 1993). In HT-29-Zellen und anderen Tumorzelllinien lieferten Experimente mit spezifischen Inhibitoren der Src-Kinase-Familie Hinweise für eine Rolle dieser Kinase bei Invasivität, Proliferation und xenogenem Tumorwachstum. (Laird et al. 2003). Weiterhin gibt es Ergebnisse über STAT3-Aktivierung in HT-29-Zellen durch die Tyrosinkinase Fer, deren Expression durch IFN- γ herabreguliert wird (Orlovsky et al. 2002).

Auch die Inaktivierung der STAT3-inhibitorischen SOCS-Proteine durch DNA-Methylierung kann zu einer konstitutiven STAT3-Aktivierung führen (Yoshikawa et al. 2001). Derartige Effekte sind für Zellen mehrerer Tumorarten beschrieben, z.B. für das hepatozelluläre Karzinom (Yoshikawa et al. 2001), das multiple Myelom (Galm et al. 2003), das Bronchialkarzinom (He et al. 2003), das Karzinom der Magenschleimhaut (To et al. 2004), für Leukämien (Chim et al. 2004) und Lymphome (Chim et al. 2004).

Durch weiterführende Experimente ließe sich die Ursache einer STAT3-Aktivierung im kolorektalen Tumorgewebe genauer untersuchen. Hierzu könnten z.B. Untersuchungen des Aktivitätszustandes von Januskinasen sowie Expressionsanalysen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren auf RNA-Ebene mit Mikroarrays orientierende Ergebnisse liefern. Genauere Kenntnisse über STAT3-aktivierende Faktoren, sowohl im primären Tumorgewebe als auch in den xenogenen Tumoren, könnten durch eine exakte Lokalisation der Synthese solcher Zytokine durch *in situ* Hybridisierung mit RNA-Sonden erhalten werden.

Eine STAT3-Aktivierung durch rezeptorunabhängige Kinasen oder durch Inaktivierung von SOCS-Proteinen ließe sich z.B. auf Proteinebene mit jeweiligen Antikörpern überprüfen.

Aufgrund der Komplexität der STAT3-aktivierenden Mechanismen ist es wahrscheinlich, daß an der Kontrolle der STAT3-Aktivität mehrere Prozesse verantwortlich sind und dabei auch individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren bestehen.

6.4 Die klinische Bedeutung konstitutiver STAT3-Aktivität für das kolorektale Karzinom

Auf der Grundlage der Analysen zur Aktivität und Funktion des Transkriptionsfaktors STAT3 im kolorektalen Karzinom lassen sich eine Vielzahl von Überlegungen zur klinischen Relevanz herleiten.

Sowohl in kolorektalen Tumoren als auch in ihren angrenzenden Geweben ließ sich in der Mehrzahl der Fälle STAT3-Aktivität nachweisen. Daher spielt STAT3 als differenzierender diagnostischer Marker bei der pathologischen Untersuchung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Dennoch wären größer angelegte Studien über einen längeren Zeitraum sinnvoll, um STAT3-Aktivität mit relevanten Prognosefaktoren zu korrelieren. Zu diesen zählen z.B. Tumorprogression, Überlebens- und Rezidivrate, Dauer des rezidivfreien Intervalls, Metastasierung und Therapieerfolg. In der Literatur sind bereits mehrere entsprechende Studien an verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben, wobei die prognostischen Aussagen von der untersuchten Tumorart abhängig waren. So ging STAT3-Phosphorylierung im Kopf- und Hals-Karzinom mit niedrigeren Überlebensraten und bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie mit verkürzten Rezidivintervallen einher (Benekli et al. 2002, Masuda et al. 2002). Im Nierenzellkarzinom ließ sich, ähnlich wie in dieser Arbeit, bei der Analyse von 48 Tumoren keine Korrelation zwischen STAT3-Aktivität und Tumorstadium, Grad oder Größe finden. Dennoch ging STAT3-Aktivierung häufiger mit Metastasierung einher (Horiguchi et al. 2002).

Im Gegensatz hierzu konnte in einer Studie zum Mammakarzinom in einem Patientenkollektiv von 346 Frauen STAT3-Phosphorylierung mit verlängertem Gesamtüberleben korreliert werden (Dolled-Filhart et al. 2003). Widschwendter et al. konnten jedoch bei Brustkrebspatientinnen weder STAT3- noch STAT5-Aktivität eine prognostische Relevanz zuschreiben (Widschwendter et al. 2002). Beim Nasopharyngealen Karzinom verbesserte STAT3-Aktivität den Radiotherapieerfolg nach Resektion (Hsiao et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich mit der höheren Therapieempfindlichkeit stark proliferierender Gewebe erklären.

Es liegen auch Ergebnisse über den Einfluß von STAT3-aktivierenden Zytokinen und Faktoren auf die Prognose des kolorektalen Karzinoms vor. So ist eine erhöhte EGF- und VEGF-Expression im Tumorgewebe von kolorektalen Karzinompatienten mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Steele et al. 1990, Galizia et al. 2004). Patienten mit

erhöhter IL-6-Serumkonzentration haben ebenfalls eine verschlechterte Prognose (Belluco et al. 2000).

Aufgrund der großen Anzahl maligner Neoplasien mit erhöhter STAT-Aktivität und dem kausalen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und STAT3-Aktivierung bereitet die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der JAK/STAT-Signaltransduktion ein breites Fundament für therapeutische Ansätze in der modernen Tumorthherapie. Es befindet sich eine Vielzahl von Signaltransduktionstherapeutika in der Entwicklung: z.B. Antikörper gegen Zytokine, Rezeptorantagonisten, Tyrosinkinase-Inhibitoren, interagierende Moleküle der STAT-DNA-Bindung, Inhibitoren der STAT- SH-2-Domäne, Aktivatoren der STAT-Inhibitoren und gentherapeutische Ansätze mit Antisense-Oligonukleotiden etc. (Bromberg 2002).

Die Arbeitsgruppe um Jove entwickelte 2001 einen spezifischen Inhibitor der SH-2-Domäne von STAT3 (Turkson et al. 2001). Im Mausmodell vermindert Gentherapie mit dominant negativem STAT3 deutlich das Wachstum von Malignen Melanomen und resultiert in einer Tumorregression (Niu et al. 1999). In Prostatakarzinomzelllinien führen Antisense-Oligonukleotide von STAT3 zu verminderter Proliferation und induzieren Apoptose (Barton et al. 2004).

Auch Prozesse, die in der Signalkette der STAT3-Aktivierung vorgeschaltet sind, können durch Inhibition Tumorwachstum und Invasivität vermindern. So konnte z.B. gezeigt werden, daß der JAK2-spezifische Inhibitor AG490 das Wachstum vieler Tumoren hemmt und Apoptose induziert. Hierzu gehören z.B. Zelllinien des Prostata- (Ni et al. 2000), Nierenzell- (Horiguchi et al. 2002), Ovarial- und Mammakarzinoms (Burke et al. 2001), sowie Myelomzellen (De Vos et al. 2000) und Zellen des Hodgkin Lymphoms (Kube et al. 2001). Auch Inhibitoren des gp130-Rezeptors führen im Mausmodell zu vermindertem Wachstum von Zelllinien des Mammakarzinoms (Selander et al. 2004). Spezifische Inhibitoren der Src-Kinase-Familie induzieren in Mammakarzinomzelllinien durch verminderte STAT3-Phosphorylierung Apoptose (Garcia et al. 2001).

Die ersten Medikamente mit Wirkung auf signaltransduktorische Prozesse haben die präklinische Phase ihrer Entwicklung überwunden und sind bereits in onkologischen Therapieprotokollen zu finden (Ravandi et al. 2002, Akira et al. 1994). Hierzu gehört STI571 („Gleevec“), ein hochpotentes Mittel bei der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) (Druker et al. 1996, Druker et al. 2001), das durch die Blockade der

Tyrosinkinaseaktivität von Bcr/Abl, v-abl, PDGF β R und c-kit (Attoub et al. 2002, Scandura et al. 2002) auch die Phosphorylierung von STAT-Proteinen beeinflusst. Tatsächlich konnte STI571 auch in mehreren Kolonkarzinomzelllinien, unter anderem in HT-29, Tumordinvasion und Proliferation hemmen (Attoub et al. 2002).

Sowohl der Antikörper gegen VEGF, Bevacizumab (Avastin[®]), (Cooke et al. 2001, Vanhoefer 2003) als auch gegen EGF, Cetuximab (Erbix[®]), (Mendelsohn 1992, Cunningham et al. 2004, Starling und Cunningham 2004) erhielten 2004 die Zulassung für die Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms. Diese Antikörper können in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika ihre Wirkung potenzieren (Folprecht und Kohne 2004). Interessanterweise inhibieren diese Antikörper Faktoren, die bekannterweise STAT3 aktivieren. Sehr aufschlußreich wäre in diesem Zusammenhang eine Analyse der STAT3-Aktivität im Tumorgewebe von Patienten, die mit Bevacizumab und Cetuximab behandelt wurden.

Neben den apoptotischen und antiproliferativen Effekten konnte durch die Suppression der STAT3-Aktivität auch eine sensitivierende Wirkung gegenüber mehreren Chemotherapeutika erzielt werden (Dalton und Jove 1999). In Glioblastomzellen war die Resistenz gegenüber Doxorubicin abhängig von autokriner STAT3-Aktivierung durch einen unbekannten Faktor. Der JAK-Inhibitor AG490 führte zur Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin (Rebbaa et al. 2001). In Zelllinien des Kopf- und Hals-Karzinoms konnte die Expression von dominant negativem STAT3 die Wirkung von 5-FU deutlich potenzieren (Masuda et al. 2002).

Von besonderem Interesse ist auch die Erkenntnis, daß die Inhibition von STAT3 weitgehend selektiv Apoptose in manchen entarteten Zellen induzieren kann, ohne dabei gesundes Gewebe zu beeinträchtigen. Dieses Phänomen weist auf die starke STAT3-Abhängigkeit dieser malignen Zellen im Vergleich zu untransformierten Geweben hin (Burke et al. 2001, Akira et al. 1994, Niu et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, die Forschungsarbeiten zu STAT3 im kolorektalen Karzinom und seinem prognostischen und therapeutischen Potential zu intensivieren.

7. Schlußfolgerungen

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist im kolorektalen Karzinom aktiviert. Dies konnte anhand von Studien zur DNA-Bindungsaktivität, Analysen zur STAT3-Phosphorylierung und dem immunhistologischen Nachweis einer erfolgten STAT3-Kerntranslokation bestätigt werden.

Zelllinien des kolorektalen Karzinoms zeigen keine konstitutive STAT3-Aktivierung. Untersuchungen zur STAT3-DNA-Bindungsaktivität an primären Tumoren, die zur Entwicklung von Zelllinien verwendet wurden, konnten nachweisen, daß STAT3-Aktivität während der Kultivierung von kolorektalen Karzinomzellen verloren geht.

STAT3 übt einen fördernden Einfluß auf die Proliferation von kolorektalen Karzinomzelllinien aus. Dies konnte einerseits anhand von STAT3-aktivierenden Zytokinstimulationen gezeigt werden. Andererseits führte sowohl eine Überexpression von STAT3 zu verstärktem als auch die Suppression von STAT3-Aktivität durch Transduktion eines dominant negativen STAT3-Konstruktes zu schwächerem Zellwachstum.

Kolorektale Karzinomzelllinien entwickeln nach xenogener Transplantation in Nacktmäuse Tumoren. Weitere Untersuchungen an Tumoren aus der kolorektalen Tumorzelllinie HT-29 in Mäusen konnten zeigen, daß STAT3 während der Tumorbildung nach xenogener Transplantation aktiviert wird. Obwohl ein Expressionsverlust von transduzierten STAT3-Varianten ausgeschlossen werden konnte, zeigten alle untersuchten Derivate der Zelllinie HT-29 nach Transplantation eine ähnlich starke STAT3-Aktivität. Hieraus wurde die Hypothese entwickelt, daß STAT3-Aktivität in xenogenen Tumoren durch begrenzende Mechanismen auf ein bestimmtes notwendiges Niveau reguliert wird.

STAT3 kann in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms auf unterschiedliche Weise aktiviert werden. Zytokinstimulationen konnten hierbei zeigen, daß IL-6 als einziger Kandidat der IL-6-Zytokin-Familie in den untersuchten Zelllinien STAT3 aktiviert. Vergleichsweise niedriger wurde STAT3 durch Stimulation von Wachstumsfaktoren wie EGF oder VEGF aktiviert.

Durch ein indirektes Verfahren konnte gezeigt werden, daß STAT3 auch auf einem autokrinen Weg in Tumorzelllinien des Kolorektums aktiviert werden kann. So führte die forcierte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zur STAT3-Aktivierung in HT-29-Zellen. Da der

Kulturüberstand dieser Zellen nach Inkubation von Kontrollen STAT3-aktivierte, ließ sich ein autokriner Mechanismus indirekt beweisen.

Die Resultate dieser Arbeit charakterisieren erstmalig STAT3-Aktivierung und Funktion sowohl in primären Tumoren als auch in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms. Es schließt sich somit einer Reihe von Tumoren an, in denen sowohl eine konstitutive STAT3-Aktivierung als auch das onkogene Potential dieses Transkriptionsfaktors gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse untermauern die Stellung von STAT3 als potentielle Zielstruktur bei der Entwicklung von Signaltransduktionstherapeutika und deren mögliche Anwendung in der Tumorthherapie des kolorektalen Karzinoms.

8. Literaturverzeichnis

- Akaishi H, Takeda K, Kaisho T, Shineha R, Satomi S, Takeda J, Akira S. 1998. Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes. *Int Immunol*, 10 (11):1747-1751.
- Akira S. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*, 19 (21):2607-2611.
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77 (1):63-71.
- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. 2001. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*, 21 (5):1621-1632.
- Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz UA, Muller W, Musiani P, Poli V, Davies AM. 2001. Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 18 (3):270-282.
- Alonzi T, Newton IP, Bryce PJ, Di Carlo E, Lattanzio G, Tripodi M, Musiani P, Poli V. 2004. Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine*, 26 (2):45-56.
- Andreyev H., Norman A, Oates J, Cunningham D, Kirsten ras mutation in patients with colorectal carcinoma: "the RASCAL II" 2001
- American Cancer Society. 1997 Annual Cancer Report.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubbs VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urošević N. 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*, 1;85(5):692-6.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*. 6;90(9):675-84.
- Aoki N, Matsuda T. 2002. A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol Endocrinol*, 16 (1):58-69.
- Arai K, Nishida J, Hayashida K, Hatake K, Kitamura T, Miyajima A, Arai N, Yokota T. 1990. [Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by cytokines]. *Rinsho Byori*, 38 (4):347-353.
- Arany I, Chen SH, Megyesi JK, Adler-Storthz K, Chen Z, Rajaraman S, Ember IA, Tying SK, Brysk MM. 2003. Differentiation-dependent expression of signal transducers and activators of transcription (STATs) might modify responses to growth factors in the cancers of the head and neck. *Cancer Lett*, 199 (1):83-89.
- Arias A, McBown A, Brennan K. 1999. Wnt signaling: pathway or network? *Current Opinion Genet Dev*, 9:447-454.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister. 2004. Jahresbericht 2004.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister. Krebs in Deutschland: Trends und Tendenzen. 2001.
- Attoub S, Rivat C, Rodrigues S, Van Bocxlaer S, Bedin M, Bruyneel E, Louvet C, Kornprobst M, Andre T, Mareel M, Mester J, Gespach C. 2002. The c-kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy. *Cancer Res*, 62 (17):4879-4883.
- Badache A, Hynes NE. 2001. Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res*, 61 (1):383-391.
- Bartoli M, Gu X, Tsai NT, Venema RC, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB. 2000. Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 275 (43):33189-33192.
- Barton BE, Murphy TF, Shu P, Huang HF, Meyenhofen M, Barton A. 2004. Novel single-stranded oligonucleotides that inhibit signal transducer and activator of transcription 3 induce apoptosis in vitro and in vivo in prostate cancer cell lines. *Mol Cancer Ther*, 3 (10):1183-1191.
- Battle TE, Frank DA. 2002. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*, 2 (4):381-392.

- Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, Lise M, Jessup JM. 2000. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 7 (2):133-138.
- Benekli M, Xia Z, Donohue KA, Ford LA, Pixley LA, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. 2002. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood*, 99 (1):252-257.
- Bergmann-Leitner ES, Abrams SI. 2000. Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL. *J Immunol*, 164 (9):4941-4954.
- Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol*, 171 (7):3863-3871.
- Bienz M. 1999. APC: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev*, 9 (5):595-603.
- Biswas SK, Sodhi A. 2002. Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol*, 2 (8):1095-1107.
- Bjornstrom L, Sjoberg M. 2004. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept*, 2 (1):3.
- Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. 2001. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 276 (50):47038-47045.
- Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411 (6835):355.
- Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. 1998. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*, 391 (6664):285-288.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19 (21):2474-2488.
- Bright-Thomas RM, Hargest R. 2003. APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, Mar;29(2):107-17.
- Bromberg J. 2000. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Res*, 2 (2):86-90.
- Bromberg J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 109 (9):1139-1142.
- Bromberg JF. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23 (2):161-169.
- Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE, Jr. 1998. Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ*, 9 (7):505-512.
- Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE, Jr. 1998. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol*, 18 (5):2553-2558.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98 (3):295-303.
- Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J. 2001. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 20 (55):7925-7934.
- Buermeier A, Deschenes S, Baker S, Liskay R. 1999. Mamalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet*, 33:533-564.
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271 (22):13221-13227.
- Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, Savarese TM. 2001. Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 158 (1):25-32.
- Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH. 1996. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol*, 16 (4):1595-1603.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10 (1):105-115.
- Cattaneo E, Magrassi L, De-Fraja C, Conti L, Di Gennaro I, Butti G, Govoni S. 1998. Variations in the levels of the JAK/STAT and ShcA proteins in human brain tumors. *Anticancer Res*, 18 (4A):2381-2387.
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271 (22):13221-13227.
- Chai SK, Nichols GL, Rothman P. 1997. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol*, 159 (10):4720-4728.
- Chang YH, Chao Y, Hsieh SL, Lin WW. 2004. Mechanism of LIGHT/interferon-gamma-induced cell death in HT-29 cells. *J Cell Biochem*, 93 (6):1188-1202.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13 (19):2604-2616.

- Chen H, Ye D, Xie X, Chen B, Lu W. 2004. VEGF, VEGFRs expressions and activated STATs in ovarian epithelial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 94 (3):630-635.
- Chen T, Wang LH, Farrar WL. 2000. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 60 (8):2132-2135.
- Chim CS, Wong AS, Kwong YL. 2004. Epigenetic dysregulation of the Jak/STAT pathway by frequent aberrant methylation of SHP1 but not SOCS1 in acute leukaemias. *Ann Hematol*, 83 (8):527-532.
- Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G. 2004. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia*, 18 (2):356-358.
- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*, 272 (5262):719-722.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Choudhury GG, Marra F, Kiyomoto H, Abboud HE. 1996. PDGF stimulates tyrosine phosphorylation of JAK 1 protein tyrosine kinase in human mesangial cells. *Kidney Int*, 49 (1):19-25.
- Christine R, Sylvie R, Erik B, Genevieve P, Amelie R, Gerard R, Marc B, Christian G, Samir A. 2005. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) - and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res*, 65 (1):195-202.
- Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, Garrigues J, Radke S, Todaro GJ, Salomon DS. 1991. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (17):7792-7796.
- Coffer P, Luttkien C, van Puijenbroek A, Klop-de Jonge M, Horn F, Kruijer W. 1995. Transcriptional regulation of the junB promoter: analysis of STAT-mediated signal transduction. *Oncogene*, 10 (5):985-994.
- Cooke SP, Boxer GM, Lawrence L, Pedley RB, Spencer DI, Begent RH, Chester KA. 2001. A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor: receptor complex. *Cancer Res*, 61 (9):3653-3659.
- Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. 2003. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*, 50 (4):316-321.
- Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, Tsareva SA, Wagner S, Pfützner E, Baus D, Kaufmann D, Huber LA, Zatloukal K, Beug H, Öhlschläger P, Schütz A, Halbhuber KJ, Friedrich K: Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. 2005. *Neoplasia*.
- Cramer A. Funktionelle Rekonstitution und Charakterisierung eines fluoreszenzmarkierten c-Met-Rezeptorkomplexes. Dissertation 2003.
- Culouscou JM, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Bettetini D, Marvaldi J, Pommier G. 1988. Autocrine secretion of a colorectum-derived growth factor by HT-29 human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 42 (6):895-901.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351 (4):337-345.
- Curran S, Murray GI. 1999. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, 189 (3):300-308.
- Dale T. 1998. Signal transduction by the wnt family of ligands. *Biochem J*, 329:209-223. Dalton WS, Jove R. 1999. Drug resistance in multiple myeloma: approaches to circumvention. *Semin Oncol*, 26 (5 Suppl 13):23-27.
- Daniel NN, Pernis A, Rothman PB. 1995. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science*, 269 (5232):1875-1877. De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. 2000. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol*, 109 (4):823-828.
- Dechow TN, Pedranzini L, Leitch A, Leslie K, Gerald WL, Linkov I, Bromberg JF. 2004. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (29):10602-10607.
- Decker T, Kovarik P. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, 19 (21):2628-2637.
- Deon D, Ahmed S, Tai K, Scaletta N, Herrero C, Lee IH, Krause A, Ivashkiv LB. 2001. Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol*, 167 (9):5395-5403.
- Dhir R, Ni Z, Lou W, DeMiguel F, Grandis JR, Gao AC. 2002. Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate*, 51 (4):241-246.

- Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, et al. 1995. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 1 (2):147-154.
- Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, Smith BL, Rimm DL. 2003. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res*, 9 (2):594-600.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2 (5):561-566.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 344 (14):1031-1037.
- Elliott BE, Hung WL, Boag AH, Tuck AB. 2002. The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Can J Physiol Pharmacol*, 80 (2):91-102.
- Enaida H, Kabuyama Y, Oshima Y, Sakamoto T, Kato K, Kochi H, Homma Y. 1999. VEGF-dependent signaling in retinal microvascular endothelial cells. *Fukushima J Med Sci*, 45 (2):77-91.
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP, Jr. 2001. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 107 (3):351-362.
- Fernandes A, Hamburger AW, Gerwin BI. 1999. ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant human lung epithelial cells. *Int J Cancer*, 83 (4):564-570.
- Fernhead NS, Britton MP, Bodmer WF, : The ABC of APC *Hum Mol Genet* 2001
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Berod L, Pöhlmann TG, Meissner A, Corvinus F, Wiederander B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K: Leukemia Inhibitory Factor triggers activation of STAT3, proliferation invasiveness, and altered protease expression in chorioncarcinoma. 2005 *Molecular Human Reproduction* (angenommen).
- Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, Haan S, Behrmann I, Yoshimura A, Johnston JA, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F. 2004. The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J*, 378 (Pt 2):449-460.
- Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland JM, Kerbel RS. 1999. Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene*, 18 (4):1023-1032.
- Folprecht G, Kohne CH. 2004. The role of new agents in the treatment of colorectal cancer. *Oncology*, 66 (1):1-17.
- Fontaine V, Mahieu M, Content J. 1998. Interferon-gamma and interleukin-6 inhibit proliferation in human melanoma cells by different signalling pathways. *Melanoma Res*, 8 (1):24-30.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 1(1):55-67.
- Frank DA, Mahajan S, Ritz J. 1997. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest*, 100 (12):3140-3148.
- Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 5 (5):449-460.
- Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Osugi T, Hirota H, Izumi M, Yoshizaki K, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. 2000. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 275 (14):10561-10566.
- Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ. 2001. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*, 13 (3):363-373.
- Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C. 2004. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res*, 10 (10):3490-3499.
- Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. 2003. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood*, 101 (7):2784-2788.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20 (20):2499-2513.

- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R. 1997. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 8 (12):1267-1276.
- Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capiod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanter-Fourt I, Dreyfus F, Groner B, Prin L. 1996. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*, 87 (5):1692-1697.
- Giri D, Ozen M, Ittmann M. 2001. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol*, 159 (6):2159-2165.
- Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD. 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (8):4227-4232.
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, et al. 1995. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J*, 14 (7):1421-1429.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hartman J. 2004. Metastasiertes kolorektales Karzinom - Stand derzeitiger Therapieoptionen. *Tumor Diagn Ther*, 25:29-34.
- Hauser PJ, Agrawal D, Hackney J, Pledger WJ. 1998. STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ*, 9 (10):847-855.
- He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F, Jablons DM. 2003. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (24):14133-14138.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297-314.
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science*, 267 (5202):1347-1349.
- Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol*, 172 (7):4630-4636.
- Hess S, Smola H, Sandaradura De Silva U, Hadaschik D, Kube D, Baldus SE, Flucke U, Pfister H. 2000. Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol*, 165 (4):1939-1948.
- Hevehan DL, Miller WM, Papoutsakis ET. 2002. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood*, 99 (5):1627-1637.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19 (21):2548-2556.
- Hiscox SE, Hallett MB, Puntis MC, Nakamura T, Jiang WG. 1997. Expression of the HGF/SF receptor, c-met, and its ligand in human colorectal cancers. *Cancer Invest*, 15 (6):513-521.
- Ho JM, Beattie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL. 1999. Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood*, 93 (12):4354-4364.
- Hoey T, Schindler U. 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5):582-587.
- Holz A, Bot A, Coon B, Wolfe T, Grusby MJ, von Herrath MG. 1999. Disruption of the STAT4 signaling pathway protects from autoimmune diabetes while retaining antiviral immune competence. *J Immunol*, 163 (10):5374-5382.
- Horiguchi A, Oya M, Marumo K, Murai M. 2002. STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int*, 61 (3):926-938.
- Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M. 2002. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol*, 168 (2):762-765.
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. 2003. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol*, 200 (5):568-576.
- Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST, Shiao AL, Wu CL, Su WC. 2003. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *Br J Cancer*, 89 (2):344-349.
- Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M, Fidler IJ. 2002. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene*, 21 (16):2504-2512.
- Huang M, Page C, Reynolds RK, Lin J. 2000. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 79 (1):67-73.
- Hunter T. 1997. Oncoprotein Network. *Cell*, 88:333-346.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409 (6818):349-354.

- Imai J, Watanabe M, Sassik M, Yamaguchi R, Tateyama S, Sugano S. 1999. Induction of c-met proto-oncogene expression at the metastatic site. *Clin Exp metastasis*, 17 (5):457-462.
- Ivanov VN, Krasilnikov M, Ronai Z. 2002. Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem*, 277 (7):4932-4944.
- Ivanov VN, Bhoomik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, Horvath CM, Ronai Z. 2001. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell*, 7 (3):517-528.
- Ivashkiv LB. 2000. Jak-STAT signaling pathways in cells of the immune system. *Rev Immunogenet*, 2 (2):220-230.
- Jass JR. 1989. Pathological staging--new methods and practical applications. *Cancer Surv.*;8(1):7-26.
- Jass JR. 1989. Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World J Surg*, 13(1):45-51
- Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X. 1998. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene*, 17 (24):3157-3167.
- Jelinek DF, Aagaard-Tillery KM, Arendt BK, Arora T, Tschumper RC, Westendorf JJ. 1997. Differential human multiple myeloma cell line responsiveness to interferon-alpha. Analysis of transcription factor activation and interleukin 6 receptor expression. *J Clin Invest*, 99 (3):447-456.
- Joo A, Aburatani H, Morii E, Iba H, Yoshimura A. 2004. STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression. *Oncogene*, 23 (3):726-734.
- Junqueira LC, Carneiro J. 1996. *Histologie*. 120-121.
- Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. 2001. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis*, 22 (7):1035-1042.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (13):7556-7561.
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J*, 15 (2):254-264.
- Kim H, Hawley TS, Hawley RG, Baumann H. 1998. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol Cell Biol*, 18 (3):1525-1533.
- Kim OS, Park EJ, Joe EH, Jou I. 2002. JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 277 (43):40594-40601.
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T. 1999. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 189 (1):63-73.
- Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, Akira S. 2003. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest*, 111 (9):1297-1308.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4 (7):844-847.
- Köhne C, Harstrick A. 2001. Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms. *UNI-MED Verlag*:16-17.
- Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, Heinrich PC, Diehl V, Tesch H. 2001. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, 98 (3):762-770.
- Laird AD, Li G, Moss KG, Blake RA, Broome MA, Cherrington JM, Mendel DB. 2003. Src family kinase activity is required for signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase phosphorylation and vascular endothelial growth factor signaling in vivo and for anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 2 (5):461-469.
- Langerak AW, De Laat PA, Van Der Linden-Van Beurden CA, Delahaye M, Van Der Kwast TH, Hoogsteden HC, Benner R, Versnel MA. 1996. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in human malignant mesothelioma in vitro and in vivo. *J Pathol*, 178 (2):151-160.
- Leaman DW, Pisharody S, Flickinger TW, Commene MA, Schlessinger J, Kerr IM, Levy DE, Stark GR. 1996. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16 (1):369-375.
- Leu CM, Wong FH, Chang C, Huang SF, Hu CP. 2003. Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*, 22 (49):7809-7818.
- Levy DE, Gilliland DG. 2000. Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene*, 19 (21):2505-2510.
- Levy DE, Lee CK. 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109 (9):1143-1148.
- Lieskovska J, Guo D, Derman E. 2003. Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. *Growth Horm IGF Res*, 13 (1):26-35.

- Lin J, Jin X, Rothman K, Lin HJ, Tang H, Burke W. 2002. Modulation of signal transducer and activator of transcription 3 activities by p53 tumor suppressor in breast cancer cells. *Cancer Res*, 62 (2):376-380.
- Liu X, Sun Y, Constantinescu S, Karam E, Weinberg A, Lodish H. 1997. Transforming growth factor -induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, 94:10669-11067.
- Lou W, Ni Z, Dyer K, Tweardy DJ, Gao AC. 2000. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. *Prostate*, 42 (3):239-242.
- Mahboubi K, Li F, Plescia J, Kirkiles-Smith NC, Mesri M, Du Y, Carroll JM, Elias JA, Altieri DC, Pober JS. 2001. Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway. *Lab Invest*, 81 (3):327-334.
- Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V. 2004. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol*, 5 (4):401-409.
- Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M, Deguchi A, Komiyama S, Weinstein IB. 2002. The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res*, 93 (3):329-339.
- Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. 2002. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 62 (12):3351-3355.
- Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. 2002. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem*, 277 (39):36167-36173.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84 (3):431-442.
- Meads MB, Medveczky PG. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral interleukin-6 is secreted and modified differently than human interleukin-6: evidence for a unique autocrine signaling mechanism. *J Biol Chem*, 279 (50):51793-51803.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F, Jr., Martinez AC. 1998. The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol*, 161 (2):805-813.
- Mendelsohn J. 1992. Epidermal growth factor receptor as a target for therapy with antireceptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (13):125-131.
- Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S. 1996. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (9):3963-3966.
- Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster MY, Bunting KD, Grosveld GC, Ihle JN. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, 10 (2):249-259.
- Moriggl R, Sexl V, Kenner L, Dunsch C, Stangl K, Gingras S, Hoffmeyer A, Bauer A, Piekorz R, Wang D, Bunting KD, Wagner FE, Sonneck K, Valent P, Ihle JN, Beug H. 2005. STAT5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell*, 7 (1):87-99.
- Morin P, Vogelstein B, Kinzler W. 1996. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:7950-7954.
- Moss SF, Liu TC. 1996. Inward growth of colonic adenomatous polyps. *Gastroenterology*
- Mynard V, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X, Catelli MG. 2002. Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology*, 143 (10):3916-3924.
- Narayan S, Roy D. 2003. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*, 2 (1):41.
- Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T. 2001. Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol*, 21 (19):6615-6625.
- Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. 2000. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 60 (5):1225-1228.
- Nicola NA. 1994. Guidebook to cytokines and their receptors. te Aufl. Oxford: Oxford University Press.
- Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N. 1997. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (13):6764-6769.

- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H. 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*, 59 (20):5059-5063.
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. 2002. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 21 (46):7001-7010.
- Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. 2002. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21 (13):2000-2008.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12 (13):2048-2060.
- Norris A, Clissold P, Askham J, Morison EE, Moncur P, McCall S, Coletta P, Meredith D, Markham A. 2000. Truncated adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein can undergo tyrosine phosphorylation. *European Journal of Cancer*, 36:525-532.
- Novak U, Marks D, Nicholson SE, Hilton D, Paradiso L. 1999. Differential ability of SOCS proteins to regulate IL-6 and CSF-1 induced macrophage differentiation. *Growth Factors*, 16 (4):305-314.
- Ortth C. 2003. Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie im kolorektalen Karzinom. Dissertation.
- Oh IH, Eaves CJ. 2002. Overexpression of a dominant negative form of STAT3 selectively impairs hematopoietic stem cell activity. *Oncogene*, 21 (31):4778-4787.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109 Suppl:S121-131.
- Orlovsky K, Theodor L, Malovani H, Chowes Y, Nir U. 2002. Gamma interferon down-regulates Fer and induces its association with inactive Stat3 in colon carcinoma cells. *Oncogene*, 21 (32):4997-5001.
- Park C, Li S, Cha E, Schindler C. 2000. Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, 13 (6):795-804.
- Park OK, Schaefer LK, Wang W, Schaefer TS. 2000. Dimer stability as a determinant of differential DNA binding activity of Stat3 isoforms. *J Biol Chem*, 275 (41):32244-32249.
- Park SH, Liu X, Hennighausen L, Davey HW, Waxman DJ. 1999. Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption. *J Biol Chem*, 274 (11):7421-7430.
- Pietra LD, Bressan A, Pezzotti AR, Serlupi-Crescenzi O. 1998. Highly conserved amino-acid sequence between murine STAT3 and a revised human STAT3 sequence. *Gene*, 213 (1-2):119-124.
- Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka H, Columbano A. 2001. Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *Faseb J*, 15 (6):1006-1013.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M. 1999. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*, 29 (12):3945-3950.
- Qiu Y, Ravi L, Kung HJ. 1998. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature*, 393 (6680):83-85.
- Ramsauer K, Sadzak I, Porras A, Pilz A, Nebreda AR, Decker T, Kovarik P. 2002. p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (20):12859-12864.
- Rane SG, Reddy EP. 2002. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*, 21 (21):3334-3358.
- Ravandi F, Talpaz M, Kantarjian H, Estrov Z. 2002. Cellular signalling pathways: new targets in leukaemia therapy. *Br J Haematol*, 116 (1):57-77.
- Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. 1999. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (6):2846-2851.
- Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*, 21 (50):7611-7618.
- Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Amelie R, Redeuilh M, Gespach C, Attoub S. 2005. Implication of STAT3 Signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor3 and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Research*, 65:195-202.
- Robert-Koch-Institut. 2004, Saarland.
- Ross PJ, George M, Cunningham D. Inhibitor of k-ras Expression in human crc using antisense oligonucleotides *Mol Can Ther* 2001
- Rebbaa A, Chou PM, Mirkin BL. 2001. Factors secreted by human neuroblastoma mediated doxorubicin resistance by activating STAT3 and inhibiting apoptosis. *Mol Med*, 7 (6):393-400.
- Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. 2001. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*, 7 (1):24-31.
- Ross P, George M, Cunningham D, DiStefano F, Jervoise N, Andreyev N, Workman P, Clarke P. 2001. Inhibition of Kirsten-ras Expression in Human Colorectal Cancer Using Rationally Selected Kirsten-ras Antisense Oligonucleotides. *Mol Canc Therap*, 1:29-41.

- Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C, La Rose J, Ho JM, Nguyen MH, Barber D, Dubreuil P, de Sepulveda P. 2002. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene*, 21 (28):4351-4362.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo J*, 18 (17):4657-4668.
- Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, Miyazaki J, van Ewijk W, Takeda J. 2001. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity*, 15 (2):261-273.
- Sartor CI, Dziubinski ML, Yu CL, Jove R, Ethier SP. 1997. Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res*, 57 (5):978-987.
- Savarese TM, Campbell CL, McQuain C, Mitchell K, Guardiani R, Quesenberry PJ, Nelson BE. 2002. Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*, 17 (6):324-334.
- Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. 2002. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene*, 21 (21):3422-3444.
- Schaefer LK, Menter DG, Schaefer TS. 2000. Activation of stat3 and stat1 DNA binding and transcriptional activity in human brain tumour cell lines by gp130 cytokines. *Cell Signal*, 12 (3):143-151.
- Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, Schaefer TS. 2002. Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*, 21 (13):2058-2065.
- Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D. 1995. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (20):9097-9101.
- Schaper F, Siewert E, Gomez-Lechon MJ, Gatsios P, Sachs M, Birchmeier W, Heinrich PC, Castell J. 1997. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett*, 405 (1):99-103.
- Schindler U, Wu P, Rothe M, Brasseur M, McKnight SL. 1995. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity*, 2 (6):689-697.
- Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. 2000. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood*, 95 (12):3765-3770.
- Schweizer U, Gunnarsen J, Karch C, Wiese S, Holtmann B, Takeda K, Akira S, Sendtner M. 2002. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol*, 156 (2):287-297.
- Seki Y, Suzuki N, Imaizumi M, Iwamoto T, Usami N, Ueda Y, Hamaguchi M. 2004. STAT3 and MAPK in human lung cancer tissues and suppression of oncogenic growth by JAB and dominant negative STAT3. *Int J Oncol*, 24 (4):931-934.
- Selander KS, Li L, Watson L, Merrell M, Dahmen H, Heinrich PC, Muller-Newen G, Harris KW. 2004. Inhibition of gp130 signaling in breast cancer blocks constitutive activation of Stat3 and inhibits in vivo malignancy. *Cancer Res*, 64 (19):6924-6933.
- Seufferlein T, Lutz M, Adler G. 2003. Multimodale Therapiekonzepte beim Kolonkarzinom. *Internist*, 44:322-335.
- Shao H, Quintero AJ, Twardy DJ. 2001. Identification and characterization of cis elements in the STAT3 gene regulating STAT3 alpha and STAT3 beta messenger RNA splicing. *Blood*, 98 (13):3853-3856.
- Shen Y, Devgan G, Darnell JE, Jr., Bromberg JF. 2001. Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, Nakashima M, Kohno S, Sekine I. 2000. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol*, 13 (9):925-933.
- Shirota K, LeDuy L, Yuan SY, Jothy S. 1990. Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 58 (4):303-308.
- Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. 1996. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 13 (2):247-254.
- Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. 2000. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*, 95 (6):2118-2125.
- Skinninger BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak TW. 2002. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99 (2):618-626.
- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. 2002. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 99(14):9433-8.
- Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB. 2003. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 22 (27):4150-4165.

- Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. 2002. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol*, 30 (3):262-271.
- Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. 2003. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*, 63 (11):2948-2956.
- Stamm LM, Raisanen-Sokolowski A, Okano M, Russell ME, David JR, Satoskar AR. 1998. Mice with STAT6-targeted gene disruption develop a Th1 response and control cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, 161 (11):6180-6188.
- Starling N, Cunningham D. 2004. Monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor in advanced colorectal cancers: present and future directions. *Curr Opin Oncol*, 16 (4):385-390.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387 (6636):917-921.
- Syed V, Ulinski G, Mok SC, Ho SM. 2002. Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*, 94 (8):617-629.
- Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. 1990. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg*, 77 (12):1352-1354.
- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. 2001. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med*, 193 (4):471-481.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10 (1):39-49.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8):3801-3804.
- Takanaga H, Yoshitake T, Hara S, Yamasaki C, Kunimoto M. 2004. cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6. *J Biol Chem*, 279 (15):15441-15447.
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*, 161 (9):4652-4660.
- Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. 1993. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest*, 91 (1):53-60.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93 (5):841-850.
- ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, 22 (16):5662-5668.
- To KF, Chan MW, Leung WK, Ng EK, Yu J, Bai AH, Lo AW, Chu SH, Tong JH, Lo KW, Sung JJ, Chan FK. 2004. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer*, 91 (7):1335-1341.
- Tsareva SA. Origins and consequences of persistent Stat3 activation in colorectal carcinoma cells. 2005. Dissertation.
- Tsareva SA, Corvinus F, Moriggl R, Pfitzner E, Wiederander B, Schütz A, Friedrich K: STAT3 activation enhances invasive growth of colon carcinoma cells by transcriptional induction of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1).in Arbeit.
- Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. 1998. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol*, 18 (5):2545-2552.
- Turkson J, Jove R. 2000. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 19 (56):6613-6626.
- Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebt S, Hamilton AD, Jove R. 2001. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*, 276 (48):45443-45455.
- Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW. 1997. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (14):7239-7244.
- Umeki K, Shiota G, Kawasaki H. 1999. Clinical significance of c-met oncogene alterations in human colorectal cancer. *Oncology*, 56 (4):314-321.

- Vécsey-Semjen B, Becker K-F, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E and Huber LA (2002) Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene* 21: 4646-4662
- Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M. 1996. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol*, 16 (4):1759-1769.
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. 1996. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *Embo J*, 15 (20):5616-5626.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319 (9):525-532.
- Vanhoefer U. 2003. [Novel molecular approaches in the therapy of advanced colorectal carcinoma]. *Onkologie*, 26 Suppl 7:70-74.
- Vultur A, Cao J, Arulanandam R, Turkson J, Jove R, Greer P, Craig A, Elliott B, Raptis L. 2004. Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells. *Oncogene*, 23 (15):2600-2616.
- Wagner HE, Barbier PA, Luder PJ, Niederhauser U. 1988 Prognosis in synchronous colorectal carcinomas. *Z Gastroenterol*, Feb;26(2):117-20.
- Wagner G, Hermanek P. 1994. Organspezifische Tumordokumentation. Aufl 1. Springer.
- Wang S, Tying SK, Townsend CM, Jr., Evers BM. 1998. Interferon-mediated activation of the STAT signaling pathway in a human carcinoid tumor. *Ann Surg Oncol*, 5 (7):642-649.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95 (1):19-29.
- Watson CJ, Miller WR. 1995. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 71 (4):840-844.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. 1995. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95 (4):1789-1797.
- Watson CJ, Miller WR. 1995. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 71 (4):840-844.
- World Cancer Research Fund. 1997. Annual Report.
- Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, Ludwig W, Gouilleux-Gruart V, Mertelsmann R, Finke J. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 88 (3):809-816.
- Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. 2003. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 22 (3):319-329.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY. 2003. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22 (10):1517-1527.
- Wen TC, Peng H, Hata R, Desaki J, Sakanaka M. 2001. Induction of phosphorylated-Stat3 following focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*, 303 (3):153-156.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82 (2):241-250.
- Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W. 2002. Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8 (10):3065-3074.
- Wong VK, Yam JW, Hsiao WL. 2003. Cloning and characterization of the promoter region of the mouse frizzled-related protein 4 gene. *Biol Chem*, 384 (8):1147-1154.
- Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*, 58 (13):2832-2837.
- Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. 2001. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (16):9050-9055.
- Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. 2003. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem*, 278 (41):40026-40031.
- Yamamoto T, Matsuda T, Junicho A, Kishi H, Saatcioglu F, Muraguchi A. 2000. Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and estrogen receptor signaling. *FEBS Lett*, 486 (2):143-148.
- Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, Shimizu T, Fujii R, Schier AF, Hirano T. 2002. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell*, 2 (3):363-375.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*, 18:143-164.

- Yeh TC, Pellegrini S. 1999. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci*, 55 (12):1523-1534.
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28 (1):29-35.
- Yoo JY, Huso DL, Nathans D, Desiderio S. 2002. Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell*, 108 (3):331-344.
- Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF. 2002. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene*, 21 (2):217-226.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264 (5155):95-98.
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28 (1):29-35.
- Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G. 2002. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*, 21 (7):1038-1047.
- Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, Majewski M, Carpentieri DF, Odum N, Morris S, Skorski T, Wasik MA. 2002. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol*, 168 (1):466-474.
- Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE, Jr. 1999. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 19 (10):7138-7146.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264 (5155):95-98.
- Zhu J, Emerson SG. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*, 21 (21):3295-3313.

9. Anhang

9.1 Publikationen

Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR: Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Oct;50(4):316-21.

Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, Tsareva SA, Wagner S, Pfitzner E, Baus D, Kaufmann D, Huber LA, Zatloukal K, Beug H, Öhlschläger P, Schütz A, Halbhuber KJ, Friedrich K: Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. 2005 *Neoplasia* (angenommen).

Fitzgerald JS, Tsareva SA, Berod L, Pöhlmann TG, Meissner A, Corvinus F, Wiederander B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K: Leukemia Inhibitory Factor triggers activation of STAT3, proliferation invasiveness, and altered protease expression in chorioncarcinoma. 2005 *Molecular Human Reproduction* (angenommen).

Kongreßbeiträge

Corvinus F, Orth C, Moriggl R, Pfitzner E, Friedrich K. Dysregulation of STAT3 activity in colorectal cancer. 5th Meeting of the Signal Transduction Society Weimar. Poster presentation November 2001.

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Wiederanders B, Kaufmann R, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich K: Constitutive activity of Signal Transducer and Activator of Transcription STAT3 in colorectal cancer cells. 6th Meeting of the Signal Transduction Society Weimar Nov.7-9, 2002

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Wiederanders B, Kaufmann R, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich KH: Activities of oncogenic STAT 3 in colorectal cancer cells. Poster presentation, Herbsttagung der GBM und der Dt. Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Halle/S, 2003

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Wiederanders B, Kaufmann R, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich K: Constitutive activity of Signal Transducer and Activator of Transcription STAT3 in colorectal cancer cells coincides with elevated metalloproteinases expression. Poster presentation, VIII th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control Brdo, Slovenia May 24-28, 2003

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Moriggl R, Pfitzner E, Halbhuber K-J, Kaufmann R, Huber L, Zatloukal K, and Friedrich K: Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with loss of cell attachment, enhanced proliferation, altered protease expression and autocrine cytokine production. Poster presentation, CellSignals Jena 03, Signaling Complexes (1st meeting of the Joint Research Centres Sonderforschungsbereich 604 and Graduiertenkolleg 768), Jena, Germany, September 25-27, 2003

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Wiederanders B, Meissner A, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich K: STAT3 drives proliferation, malignant transformation and invasive behavior of

colon carcinoma cells. Poster presentation, 7th Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar, November 15-17, 2003

Tsareva SA, Corvinus F, Orth C, Wiederanders B, Meissner A, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich K: Konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in Colonicarcinom Zellen ist assoziiert mit erhöhter MMP-Expression. Vortrag, „VII-Jenaer Proteolysetag“, Pörsneck, Deutschland, Oktober 17, 2003

Fitzgerald JS, Corvinus F, Berod L, Tsareva SA, Pöhlmann T, Friedrich K, and Markert U R: Cytokine Influences on Invasiveness Related Functions of JEG-3 Choriocarcinoma Cells, Vortrag, „Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)“, Jena, Deutschland, September 9, 2003

Fitzgerald JS, Corvinus F, Berod L, Pöhlmann T, Friedrich K, Markert UR. Leukemia Inhibitory Factor Induces Stat3 DNA-Binding Activity in Jeg-3 Choriocarcinoma Cells. J Reprod Immunol, 2003, 58: 162.

Fitzgerald JS, Corvinus F, Berod L, Pöhlmann T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Induziert Stat3 DNA -Bindungsaktivität in Jeg-3 Choriocarcinom Zellen. Z Geburtsh Neonatol 2003; 207 Suppl. 2: S123

Fitzgerald JS, Corvinus F, Berod L, Pöhlmann T, Friedrich K, Schleussner E, Markert UR. Stat3 DNA -Binding Activity in Jeg-3 Choriocarcinoma Cells is inducible by Leukemia Inhibitory Factor. Placenta 2003; 24:A62

Fitzgerald JS, Corvinus F, Berod L, Pöhlmann T, Friedrich K, Markert UR. Leukemia Inhibitory Factor Induces Stat3 DNA -Binding Activity in Jeg-3 Choriocarcinoma Cells. Am. J. Reprod. Immunol, 2003, 49: 344.

Pöhlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Tsareva SA, Wengenmayer T, Berod L, Corvinus F, Friedrich K, and Markert UR: Trophoblast invasiveness and intracellular STAT3 signal transduction, Oral presentation, „Joint Annual Meeting of Immunology of the Dutch and German Societies for Immunology (NVvI, DGfI)“, Maastricht, the Netherlands, October 20-23, 2004

Tsareva SA, Corvinus F, Wiederanders B, Meissner A, Pfitzner E, Moriggl R, and Friedrich K: STAT3 drives proliferation, malignant transformation and invasive behavior of colon carcinoma cells. Poster presentation, Signal Transduction 2004, Luxembourg, January 25-28th, 2004

Corvinus F, Tsareva SA, Orth C, Moriggl R, Pfitzner E, Huber LA, Zatloukal K, and Friedrich K: Constitutive STAT3 activity in colorectal cancer coincides with Loss of Cell Attachment, Enhanced Proliferation and Autocrine Cytokine Production. Poster presentation, Signal Transduction 2004, Luxembourg, January 25-28, 2004

Tsareva SA, Orth C, Corvinus F, Meissner A, Wiederanders B, Pfitzner E, Friedrich K: Constitutive activity of transcription factor Stat3 in colorectal cancer cells is associated with

enhanced expression of metalloproteinase-1. Oral Presentation, 21st Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Italia, Februar 25-29, 2004

Tsareva SA, Moriggl R, Corvinus F, Pfitzner E, Wiederanders B, Schütz A, and Friedrich K: STAT3 activation enhances invasive growth of colon carcinoma cells by transcriptional induction of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1). Poster presentation, 8th Joint Meeting Signal Transduction, Weimar, November 4-6, 2004

Jena, den 4. März 2005

9.2 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Karlheinz Friedrich, daß er mir diese Arbeit anvertraut hat. Ich habe viel von Ihm gelernt und er hat mir durch diese Arbeit viele Türen geöffnet. Danke auch für die Geduld bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke Richard Moriggl für seine großartige Betreuung am IMP und die schöne Zeit mit ihm und seiner Familie in Wien.

Herzlichen Dank an Prof. Halbhuber und Frau Möller für die freundliche Unterstützung bei den histologischen Arbeiten.

Vielen Dank auch an Prof. Wiederanders für Engagement und dafür, daß ich an seinem Institut arbeiten konnte.

Svetlana Tsareva und Stefan Wagner möchte ich für die Mithilfe bei den Arbeiten zur Publikation danken.

Ich danke Edith Pfitzner und Frauke Döll für die freundliche Betreuung während meines Aufenthaltes am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt.

Vielen Dank an Carina Orth für die Einarbeitung während der Anfangszeit.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe: Svetlana Tsareva, Martin Augsten, Sebastian Krause, Reinhard Beier, Yalkun Sopi, Jochen Behrens, dafür, daß es großen Spaß gemacht hat, mit euch zusammenzuarbeiten.

Ich danke meinem treuen Weggefährten Alexander Cramer. Ohne Dich wäre alles ganz anders gewesen.

Ich danke meinen Eltern, daß sie mir das Studium ermöglicht haben und sie mich immer unterstützen.

Danke Melanie für die nervenaufreibende Korrektur meiner Rechtschreibfehler und dafür, daß Du immer zu mir hältst.

Danke an Birgit Schade für die Hilfe im Labor.

Danke an Hartmut Beug, daß er mir zweimal den Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe am IMP in Wien ermöglicht hat.

Ich bedanke mich bei Lukas Huber für die verwendeten CoGa-Zelllinien und Kurt Zatoukal für die Primärtumoren dieser Linien.

Vielen Dank an Prof. Patt und Frau Glupsch für die freundliche Zusammenarbeit.

Den Boehringer Ingelheim Fonds möchte ich für das großzügige Reisestipendium für den Aufenthalt am IMP in Wien danken.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Matthias Corvinus
Geburtsdatum: 17.01.1977
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig

Schulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1983-1987 | Grundschule Burgholzhausen in Friedrichsdorf |
| 1987-1991 | Phillipp-Reis Schule, Gesamtschule in Friedrichsdorf |
| 1991-1996 | Kaiserin-Friedrich-Schule, humanistisches Gymnasium in Bad Homburg |
| 1993-1994 | High School Diploma an der Central Kings Rural High School in Neu Schottland, Kanada |
| 06/1996 | Abitur an der Kaiserin-Friedrich-Schule in Bad Homburg |
| 1996-1997 | Zivildienst in der Krankenpflege am Kreiskrankenhaus Bad Homburg |

Studium

| | |
|----------------|--|
| 1997-2004 | Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena |
| 11/2001-3/2005 | Promotion am Institut für Biochemie 1 der Universitätsklinik Jena |
| 2.12.2004 | 3. Staatsexamen, Abschluß des Studiums |
| 01/2005 | Approbation |

Jena, 4.März 2005

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Die Dissertation habe ich selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts wurde ich von Herrn PD Dr. rer. nat. Karlheinz Friedrich vom Institut für Biochemie I unterstützt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, erhalten.

Ich erkläre außerdem, daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 4. März 2005

Florian Corvinus